

Zeste 基因抑制子基因 12 在糖尿病肾脏病模型大鼠肾组织中的表达

赵璐¹, 赵逸菲², 高达¹, 刘艳芳³, 付婷婷¹, 徐江雁⁴<https://doi.org/10.12307/2022.1001>

投稿日期: 2021-10-25

采用日期: 2022-01-13

修回日期: 2022-04-23

在线日期: 2022-05-30

中图分类号:

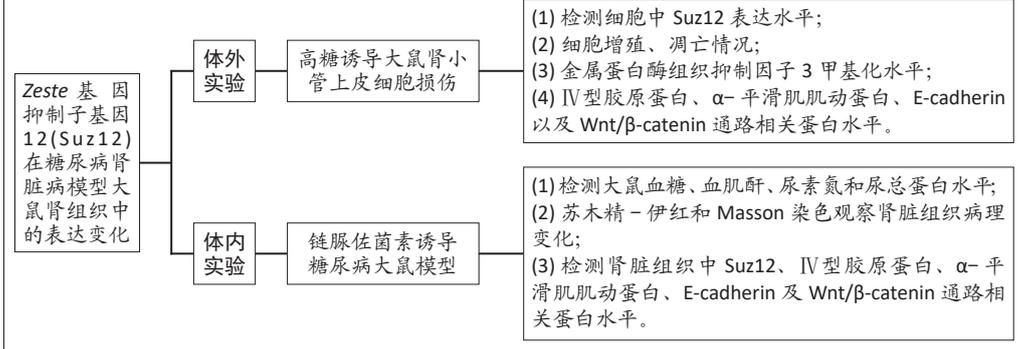
R459.9; R318; R587.1

文章编号:

2095-4344(2023)08-01179-08

文献标识码: B

文章快速阅读: Suz12 在糖尿病肾脏病进程中的变化



文题释义:

糖尿病肾脏病: 是由糖尿病引起的肾脏疾病, 属于糖尿病最严重的微血管并发症之一, 已成为世界终末期肾脏病的第2位原因, 仅次于肾小球肾炎。肾小管间质纤维化是导致糖尿病终末期肾功能衰竭的主要原因之一。

SUZ12: 是 Polycomb 抑制复合物 2(PRC2)的核心蛋白, 是一种组蛋白甲基化转移酶, 指导组蛋白3赖氨酸 27 (H3K27Me3)的甲基化和基因沉默。研究表明, SUZ12 蛋白在包括肾癌在内的多种肿瘤中过度表达, 促进肿瘤细胞迁移、侵袭以及上皮间质转化。其中, 上皮细胞-间充质细胞转化是导致糖尿病肾脏病肾脏纤维化发生的机制之一, 因此SUZ12可能在糖尿病肾脏病的发展过程中起着至关重要的作用。

摘要

背景: Zeste基因抑制子基因12(Suppressor of zeste gene 12, Suz12)可参与肾小管上皮细胞的上皮间质转化。

目的: 探讨Suz12对糖尿病肾脏病进程的影响及其相关作用机制。

方法: ①细胞实验: 将大鼠肾小管上皮细胞分为正常对照组(葡萄糖5.5 mmol/L)、高糖组(葡萄糖30 mmol/L)和高渗组(葡萄糖5.5 mmol/L+甘露醇24.5 mmol/L); 将100 nmol/L Suz12小干扰RNA(siRNA)及其阴性对照(NC siRNA)转染至高糖培养的肾小管上皮细胞中后48 h, 采用Western blotting、CCK-8和流式细胞仪检测Suz12、IV型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白和E-cadherin的蛋白表达、细胞增殖和凋亡。采用染色质免疫共沉淀检测Suz12和金属蛋白酶组织抑制因子3的结合; 金属蛋白酶组织抑制因子3表达抑制与组蛋白H3K27me3水平增加有关, 以甲基化特异性PCR法检测金属蛋白酶组织抑制因子3组蛋白H3K27me3甲基化水平; 采用Wnt/ β -catenin通路激活剂TDZD-8(10 μ mol/L, 1 h)处理转染Suz12 siRNA的肾小管上皮细胞, 以验证Wnt通路的激活是否影响干扰Suz12对细胞损伤的作用。②动物实验: 采用腹腔注射60 mg/kg链脲佐菌素构建糖尿病大鼠模型, 并通过尾静脉注射0.1 mL含 3×10^8 PFU空腺病毒载体(NC siRNA)或Suz12 siRNA腺病毒(Suz12 siRNA)的PBS; 实验结束后收集血清、尿液和肾脏组织, 采用全自动生化分析仪检测血糖、血肌酐、尿氮素、尿总蛋白水平; 苏木精-伊红和Masson 染色观察肾脏组织形态学变化; Western blotting检测肾脏组织中相关蛋白的表达水平。

结果与结论: ①与正常对照组相比, 高糖组肾小管上皮细胞中Suz12、IV型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白蛋白表达水平明显升高, E-cadherin蛋白表达水平明显降低, 细胞增殖减少, 凋亡率增加; 而转染Suz12 siRNA可逆转高糖处理对肾小管上皮细胞的损伤; ②与高糖+Suz12 siRNA组相比, TDZD-8处理可逆转Suz12敲低对肾小管上皮细胞中IV型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、E-cadherin和Wnt通路相关蛋白表达水平、细胞增殖和凋亡的影响; ③Suz12可与金属蛋白酶组织抑制因子3结合, 显示金属蛋白酶组织抑制因子3存在H3K27me3修饰, 且敲低Suz12可降低高糖诱导的肾小管上皮细胞中金属蛋白酶组织抑制因子3甲基化水平; ④与糖尿病组相比, Suz12 siRNA组大鼠血糖、血肌酐、尿氮素、尿总蛋白水平明显降低, 肾脏组织病理变化和纤维增生得到缓解, IV型胶原蛋白、Suz12和Wnt通路相关蛋白表达水平显著降低, E-cadherin表达水平明显升高; ⑤结果表明, Suz12在糖尿病大鼠中可能通过促进金属蛋白酶组织抑制因子3甲基化参与糖尿病肾脏病发展。

关键词: 糖尿病肾脏病; Suz12; TIMP3; 甲基化; Wnt/ β -catenin信号通路

缩略语: Zeste基因抑制子基因12: Suppressor of zeste gene 12, Suz12; 金属蛋白酶组织抑制因子3: tissue inhibitor of metalloproteinases-3, TIMP3

河南中医药大学第三附属医院,¹内分泌科,³肾病科, 河南省郑州市 450008; ²河南中医药大学龙子湖校区, 河南省郑州市 450046; ⁴河南中医药大学, 河南省郑州市 450046

第一作者: 赵璐, 女, 1974年生, 2011年山东中医药大学毕业, 博士, 副主任中医师, 主要从事内分泌代谢研究。

通讯作者: 徐江雁, 博士, 教授, 副校长, 河南中医药大学, 河南省郑州市 450046

<https://orcid.org/0000-0002-4505-6361> (赵璐)

基金资助: 国家重点研发计划项目(2020YFE0201800), 项目负责人: 徐江雁

引用本文: 赵璐, 赵逸菲, 高达, 刘艳芳, 付婷婷, 徐江雁. Zeste基因抑制子基因 12 在糖尿病肾脏病模型大鼠肾组织中的表达

[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(8):1179-1186.



Expression of suppressor of Zeste 12 in kidney tissues of rats with diabetic nephropathy

Zhao Lu¹, Zhao Yifei², Gao Da¹, Liu Yanfang³, Fu Tingting¹, Xu Jiangyan⁴

¹Department of Endocrinology, ²Department of Nephrology, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China; ³Longzi Hu Campus, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China; ⁴Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Zhao Lu, MD, Associate chief physician, Department of Endocrinology, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Corresponding author: Xu Jiangyan, MD, Professor, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Suppressor of Zeste 12 (Suz12) can participate in the epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells.

OBJECTIVE: To investigate the effect of Suz12 on the progression of diabetic nephropathy and its related mechanism.

METHODS: (1) Cell experiment: Rat renal tubular epithelial cells were set as normal control group (glucose 5.5 mmol/L), high glucose group (glucose 30 mmol/L), and hypertonic group (glucose 5.5 mmol/L+mannitol 24.5 mmol/L). After transfection of 100 nmol/L Suz12 small interfering RNA (siRNA) and its negative control (NC siRNA) into renal tubular epithelial cells cultured in high glucose, western blot, cell counting kit-8, and flow cytometry were used to detect the protein expression of type IV collagen, Suz12, α -smooth muscle actin, and E-cadherin, cell proliferation and apoptosis, respectively. Subsequently, chromatin immunoprecipitation was used to detect the binding of Suz12 and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3). The inhibition of TIMP3 expression is associated with the increase of trimethylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27me). Methylation-specific PCR method was used to detect the methylation level of TIMP3 histone H3K27me3. Renal tubular epithelial cells were treated with Wnt/ β -catenin pathway activator TDZD-8 (10 μ mol/L; 1 hour) to verify whether the activation of Wnt pathway influences the effects of Suz12 on cell injury. (2) Animal experiment: A diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin, and then 0.1 mL of PBS solution containing 3×10^8 PFU empty adenovirus vector (NC siRNA) or Suz12 siRNA adenovirus (Suz12 siRNA) was injected through the tail vein. After the experiment, serum, urine, and kidney tissues were collected, and the contents of blood glucose, serum creatinine, urinary nitrogen and total urinary protein were detected by an automatic biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin and Masson staining were used to observe the renal histomorphological changes. Western blot assay was used to detect the expressions of related proteins in kidney tissues.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normal control group, the expression levels of Suz12, type IV collagen, α -smooth muscle actin in the renal tubular epithelial cells were significantly increased, E-cadherin expression was decreased, cell proliferation was decreased, and the apoptotic rate was increased in the high glucose group, whilst transfection of Suz12 siRNA could reverse the damage of high glucose treatment to the renal tubular epithelial cells. Compared with the high glucose+Suz12 siRNA group, TDZD-8 treatment could reverse the effects of Suz12 knockdown on type IV collagen, α -smooth muscle actin, E-cadherin and Wnt pathway related protein expression levels, cell proliferation and apoptosis of renal tubular epithelial cells. Suz12 could specifically bind to TIMP3 protein, indicating that TIMP3 is modified by H3K27me3, and knockdown of Suz12 reduced the level of TIMP3 methylation in high glucose-stimulated renal tubular epithelial cells. Compared with the diabetic model group, serum glucose, serum creatinine, urinary nitrogen, and urinary total protein contents were significantly decreased, renal histopathological changes and fibrous hyperplasia were alleviated, and Suz12, collagen 4, α -smooth muscle actin, E-cadherin and Wnt pathway related protein expression levels were significantly decreased in the diabetic model+Suz12 siRNA group. The above results indicate that Suz12 may be involved in the development of diabetic nephropathy by promoting the methylation of TIMP3 in diabetic rats.

Key words: diabetic nephropathy; Suz12; TIMP3; methylation; Wnt/ β -catenin signaling pathway

Funding: the National Key R&D Program Project of China, No. 2020YFE0201800 (to XYJ)

How to cite this article: ZHAO L, ZHAO YF, GAO D, LIU YF, FU TT, XU JY. Expression of suppressor of Zeste 12 in kidney tissues of rats with diabetic nephropathy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(8):1179-1186.

0 引言 Introduction

1936年, KIMMELESTIEL和WILSON首先报道了由糖尿病引起的慢性肾脏疾病,并将其定名为糖尿病肾病。2007年,美国肾脏病基金会建议将糖尿病肾病这一专业术语替换为糖尿病肾脏病。糖尿病肾脏病是糖尿病最常见且严重的微血管并发症之一,最终发展至终末期导致肾衰竭^[1]。研究发现,在糖尿病肾脏病肾脏组织中金属蛋白酶组织抑制因子3(tissue inhibitor of metalloproteinases-3, TIMP3)的表达水平显著降低,但这种降低的原因仍然未知^[2]。而TIMP3表达抑制与组蛋白H3第27位赖氨酸甲基化(H3K27me)水平增加有关^[3],可见组蛋白甲基化可能是参与糖尿病肾脏病发展的一个关键因素。Zeste基因抑制子基因12(Suppressor of zeste-12, Suz12)是一种组蛋白甲基化转移酶^[4],有研究表明, Suz12在肾癌组织中表达显著高于癌旁组织,提示其参与肾癌发展^[5]。Suz12促进恶性肾干细胞的积累,导致肾分化的丧失,抑制肾再生^[6]。以上说明 Suz12与肾脏疾病密切相关,但在糖尿病肾脏病研究领域尚未见报道。此外, Wnt/ β -catenin信号通路激活可参与糖尿病肾脏病的系膜细胞凋亡和上皮间质转化形成、足细胞功能障碍和肾小管细胞上皮间质转化,进而导致肾损伤和间质纤维化^[7]。有研究显示, Wnt/ β -catenin通路蛋白Wnt4、 β -catenin和p-GSK-3 β 在糖尿

病肾脏病患者肾脏组织中高表达,且抑制Wnt- β -catenin信号通路可促进人肾小管上皮细胞增殖,减少细胞凋亡^[8]。因而,此次研究通过构建糖尿病大鼠模型和高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞,探讨 Suz12在糖尿病肾脏病进展中的作用及潜在分子机制,为临床治疗糖尿病肾脏病提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物体内实验和细胞学体外实验,组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年4月至2021年6月在河南中医药大学实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级6周龄Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠40只,体质量(200 \pm 20)g,购自河南省实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(豫)2017-0001。

实验方案经河南中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号:HNUCM-2020042。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 药物与试剂 TDZD-8,美国Sigma公司(货号:361540);大鼠肾小管上皮细胞购自美国ATCC细胞库;链脲佐菌素购自美国Sigma公司;DMEM培养液、胎牛血清购自美国

Hyclone 公司; 青霉素 - 链霉素、0.25% 胰蛋白酶 /EDTA 消化液购自美国 Sigma 公司; 转染试剂 Lipofectamine®3000 购自美国 Sigma 公司; Suz12、IV 型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、E-cadherin、Wnt2、 β -catenin 和 c-Myc 等一抗及相应二抗购自英国 Abcam 公司; Suz12 siRNA 和对照 siRNA 均购自广州锐博生物; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Vazyme 生物科技有限公司 (货号: Q511-02); RNA 提取试剂盒购自大连 Takara 公司 (货号: 9108); TIANamp Genomic DNA 提取试剂盒购自北京天根公司 (货号: DP304-02); EZ DNAmethylation-gold kit 购自美国 ZYMO (货号: D5008); RT 反转录试剂盒购自 Vazyme 生物科技有限公司 (货号: R312-01); 蛋白提取试剂盒购自美国 Millipore 公司; 引物合成由上海生工合成; CCK-8 试剂盒购自美国 MCE 公司 (货号: HY-K0301); Annexin V-FITC 检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司 (货号: FA101-01); Masson 三色染色试剂盒购自美国 Sigma 公司 (货号: CS0760)。

1.3.3 主要仪器 高通量 RT-qPCR 仪 (Roche 公司, 瑞士); Western blotting 系统 (北京六一仪器厂 DYY-7C); 台式低温高速离心机 (日本 KUBOTA 公司); 细胞培养箱 (上海力申科学仪器公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); 凝胶成像分析仪 (广州瑞丰实验设备有限公司); 全自动生化分析仪 (美国 Beckman 公司)。

1.4 方法

1.4.1 糖尿病大鼠模型构建及分组 将 40 只大鼠以普通饲料适应性喂养 1 周, 依体质量进行编号, 按照随机数字表法分成 4 组, 分别为正常对照组、糖尿病模型组、糖尿病模型 + NC siRNA 组和糖尿病模型 + Suz12 siRNA 组, 每组 10 只。造模前禁食 8 h, 后 3 组按照 60 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射 1% 的链脲佐菌素溶液 (链脲佐菌素溶于 0.1 mol/L 的 pH 4.2 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液) 构建糖尿病模型, 正常对照组注射等量柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液。饲养期间每天更换大鼠垫料、饮水、饲料。

链脲佐菌素注射 72 h 后, 大鼠尾尖采血, 检测大鼠随机血糖, 以血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 且尿糖阳性者判定为造模成功, 对于建模不成功的, 补充大鼠, 保证每组 10 只。回笼继续饲养 4 周后, 糖尿病模型组大鼠麻醉后分别通过尾静脉注射 0.1 mL 含 3×10^8 PFU 空腺病毒载体 (NC siRNA) 或 Suz12 siRNA 腺病毒组 (Suz12 siRNA) 的 PBS, 2 周后通过静脉重复注射相同剂量的 Suz12 siRNA 和 NC siRNA 的腺病毒载体。注射病毒载体 4 周后, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 (10 mL/kg) 麻醉后颈椎脱位法处死大鼠, 收集腹主动脉血和尿液, 用于相关指标检测; 并在无菌条件下暴露腹腔, 摘取双肾, 并沿矢状面切开成两片, 一半浸泡于 40 g/L 多聚甲醛用于观察肾组织病理学改变, 另一半组织洗净后置于 -80 °C 冰箱保存, 用于相关蛋白的检测。

1.4.2 生化指标检测 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白水平。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	研究 SUZ12 基因在糖尿病肾脏病中的作用机制
选择动物的条件	健康雄性 SPF 级 6 周龄 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	链脲佐菌素对一定种属动物的胰岛 β 细胞有选择性破坏作用, 能诱发许多动物产生糖尿病, 一般采用大鼠和小鼠制造动物模型, 且雄性大鼠的成模率高于雌性大鼠
动物来源及品系	健康 SPF 级 SD 雄性大鼠, 购自河南省实验动物中心
造模技术描述	随机选取 30 只大鼠, 一次性腹腔注射 60 mg/kg, 1% 的链脲佐菌素溶液 (链脲佐菌素溶于 0.1 mol/L 的 pH 4.2 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液) 构建糖尿病模型, 正常对照组注射等量柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液
动物数量及分组方法	40 只 SD 大鼠进行编号, 抓阄选出 10 只, 为正常对照组; 随后再使用随机数字表抄录 30 个数字, 除以 3, 以余数为 0, 1, 2 代表糖尿病模型组、糖尿病模型 + NC siRNA 组、糖尿病模型 + Suz12 siRNA 组 (每组 10 只)
造模成功评价指标	注射链脲佐菌素 72 h 后, 测定大鼠随机血糖, 血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 且尿糖阳性者判定为造模成功
造模后观察指标	采集大鼠肾脏组织, Western blotting 检测组织中 IV 型胶原蛋白、Suz12、Wnt2、 β -catenin 和 C-Myc 的蛋白表达水平; 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白水平; 苏木精 - 伊红和 Masson 染色观察各组大鼠肾组织形态学变化
造模后动物处理	造模完成后, 大鼠分笼饲养, 每只大鼠腹腔注射 40×10^6 U 青霉素, 预防感染。所有实验完成后, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 (10 mL/kg) 麻醉后采用颈椎脱位法处死大鼠
伦理委员会批准	实验方法得到河南中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: HNUCM-2019042

1.4.3 苏木精 - 伊红、Masson 染色观察肾脏病理学变化

苏木精 - 伊红染色: 将浸泡在含 40 g/L 多聚甲醛的肾脏组织进行石蜡包埋, 再用切片机制作厚度约为 3 μ m 的石蜡切片, 脱水透明后进行苏木精 - 伊红染色, 光学显微镜下进行分析。

Masson 染色: 采用 Masson 三色染色试剂盒对已制备好的石蜡切片进行染色, 光学显微镜下进行分析。

1.4.4 细胞培养及分组 将大鼠肾小管上皮细胞复苏后, 置于含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素 (100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 的 DMEM 培养基于 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 恒温箱中培养, 每两三天更换 1 次培养基。当细胞汇合至 80% 时, 用胰蛋白酶消化重悬后按照 3 : 1 的比例进行传代培养, 每 24 h 更换 1 次培养基。传至第 3 代, 于 6 孔板中用含正常糖 DMEM 培养基培养细胞 12 h, 弃掉 DMEM。再分为 3 组, 正常对照组 (正常糖)、高糖组、高渗组; 其中正常对照组使用体积分数 10% 胎牛血清正常糖 DMEM 培养基、高糖组使用含体积分数 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基 (调节葡萄糖终浓度为 30 mmol/L)、高渗组使用含体积分数 10% 胎牛血清高渗 DMEM 培养基 (调节甘露醇终浓度为 30 mmol/L)。继续培养 48 h, 裂解细胞收集蛋白; 细胞高糖刺激 24 h 后, 添加 10 μ mol/L Wnt/ β -catenin 通路激活剂 TDZD-8 共孵育 1 h 以诱导通路激活。

1.4.5 siRNA 介导的 *Suz12* 基因沉默 根据 GenBank 中 *Suz12* 基因序列, 采用 siDESIEN 软件设计引物, BLAST 对比序列同源性。靶向 *Suz12* 基因的 siRNA 序列由上海生工合成。利用 Lipofectamine®3000 分别将 100 nmol/L *Suz12* siRNA 和阴性对照 (NC siRNA) 转染至肾小管上皮细胞中, 转染 48 h 后, 将细胞用于后续的免疫印迹、细胞增殖和凋亡实验。以 NC siRNA 作为对照。

1.4.6 RT-qPCR 检测 TIMP3 表达水平 按照 TRIZOL 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA。随后, 使用 Takara 反转录试剂盒反转录各组检测基因, 并使用 SYBR Green PCR Master Mix 扩增反转录后的产物。TIMP3 上游引物: 5'-GGT GGT GGG GAA GAA GCT GG-3'; 下游引物: 5'-TCC CAC CTC TCC ACG AAG TT-3'。β-actin 上游引物: 5'-TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC-3'; 下游引物: 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3'。随后采用 Applied Biosystems 7900HT qPCR 系统按照以下参数进行 qPCR: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 25 s, 在 72 °C 延伸 15 s, 进行 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各样本 mRNA 的相对表达量。

1.4.7 免疫印迹法 (Western blotting) 检测大鼠肾组织和肾小管上皮细胞中 *Suz12*、IV 型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白、E-cadherin 和 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白 Wnt2、β-catenin 和 c-Myc 的表达

组织中蛋白上样工作液制备: 将 0.02 g 肾组织和 200 μL 蛋白裂解液置于玻璃匀浆器内, 研磨后离心, 吸出上清液; 将一定量蛋白原液和 5× 蛋白上样缓冲液按比例制备 (1× 蛋白上样工作液)。

细胞中蛋白上样工作液制备: 将各组细胞按照每孔 1×10^5 接种于 6 孔板, 24 h 后换液, 进行无血清培养基培养。

24 h 后采用 BCA 法进行蛋白定量, 随后各取 30 μL 样品进行 SDS-PAGE, 再将蛋白转移至膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗为兔抗 *Suz12* (1 : 10 000, ab175187)、兔抗 IV 型胶原蛋白 (1 : 2 000, ab182744)、兔抗 α-平滑肌肌动蛋白 (1 : 1 000, ab108531)、兔抗 E-cadherin (1 : 20 000, ab40772)、兔抗 Wnt2 (1 : 1 000, ab109222)、兔抗 β-catenin (1 : 10 000, ab32572)、兔抗 c-Myc (1 : 1 000, ab32072) 和兔抗 GAPDH (1 : 2 500, ab9485), 4 °C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 II 抗 (1 : 1 000) 37 °C 孵育 45 min, 用 ECL 液显影, 使用化学发光试剂盒在化学发光系统检测, 随后结果采用 Image-Pro Plus 6 软件 (Media Cybernetics) 分析, 以待测蛋白与内参照 β-actin 的灰度值比值作为蛋白的相对表达量。

1.4.8 肾小管上皮细胞增殖能力检测 将各组细胞按照每孔 1×10^5 接种于 96 孔板中, 用 10% DMEM 培养基重选细胞, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的条件下培养。每组设 5 个复孔, 待细胞长至 80% 融合时, 分别于转染后 24, 48 和 72 h 加入 20 μL CCK-8 溶液。培养 24 h, 于酶标仪 450 nm 处检测吸光度值。取 5 孔吸光度值的平均数, 按照下列公式计算细胞相对活力: 细胞相对活力 (%) = 处理组吸光度值 / 对照组吸光度

值 × 100%。

1.4.9 肾小管上皮细胞凋亡能力检测 将各组细胞按照每孔 1×10^5 接种到 6 孔板 12 h 后换液, 进行 24 h 无血清培养基培养。根据制造商说明使用双染凋亡试剂盒 Annexin-V FITC/PI 处理细胞, 于 1 h 内, 在流式细胞仪上使用 Beckman CXP 软件检测细胞凋亡情况。

1.4.10 染色质免疫共沉淀检测 TIMP3 上 H3K27me3 水平 采用染色质免疫共沉淀实验以验证 TIMP3 和 *Suz12* 以及 H3K27me3 的结合。将 DNA-蛋白质复合物与体积分数 1% 的甲醛在 37 °C 下交联 10 min。然后将细胞在 RIPA 裂解液中裂解, 将裂解物中的染色质 DNA 超声处理成片段。用非特异性 IgG、*Suz12* 或 H3K27me3 抗体形成免疫复合物, 纯化沉淀的染色质 DNA 并使用 RT-qPCR 检测 TIMP3 表达。

1.4.11 甲基化特异性 PCR 采用 TIANamp Genomic DNA 提取试剂盒并按照说明书提取 DNA 后, 使用 EZ DNAmethylation-gold kit 对提取的 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。随后, 对亚硫酸氢盐修饰 DNA 进行特异性甲基化 PCR。PCR 反应在 Applied Biosystems 7900HT qPCR 系统中进行, 总反应体系为 25 μL, 反应条件如下: 95 °C, 10 min, 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 40 次。PCR 反应结束后, 产物经凝胶电泳鉴定, 并用凝胶成像系统采集凝胶图像。

1.5 主要观察指标 ① CCK-8 法检测高糖处理的肾小管上皮细胞在 24, 48 和 72 h 的细胞活力; ② 流式细胞术检测高糖处理的肾小管上皮细胞的凋亡情况; ③ Western blotting 检测高糖处理的肾小管上皮细胞和糖尿病肾病大鼠肾脏组织中 *Suz12*、IV 型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白、E-cadherin、Wnt2、β-catenin 和 C-Myc 的蛋白表达水平; ④ 甲基化特异性 PCR 检测 TIMP3 甲基化水平; ⑤ 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白含量; ⑥ 苏木精-伊红和 Masson 染色观察各组大鼠肾脏组织形态学变化。

1.6 统计学分析 文章统计学方法已经通过河南中医药大学第三附属医院生物统计学专家审核。数据均采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 将 40 只 SD 大鼠分为 4 组、每组 10 只。给药及造模过程中, 正常对照组未出现死亡, 糖尿病模型组 1 只因高血糖死亡, 糖尿病模型 +NC siRNA 组和糖尿病模型 +*Suz12* siRNA 组因操作不当各死亡 1 只, 针对这 3 只大鼠已进行后续实验补充, 动物总死亡率为 7.5%。

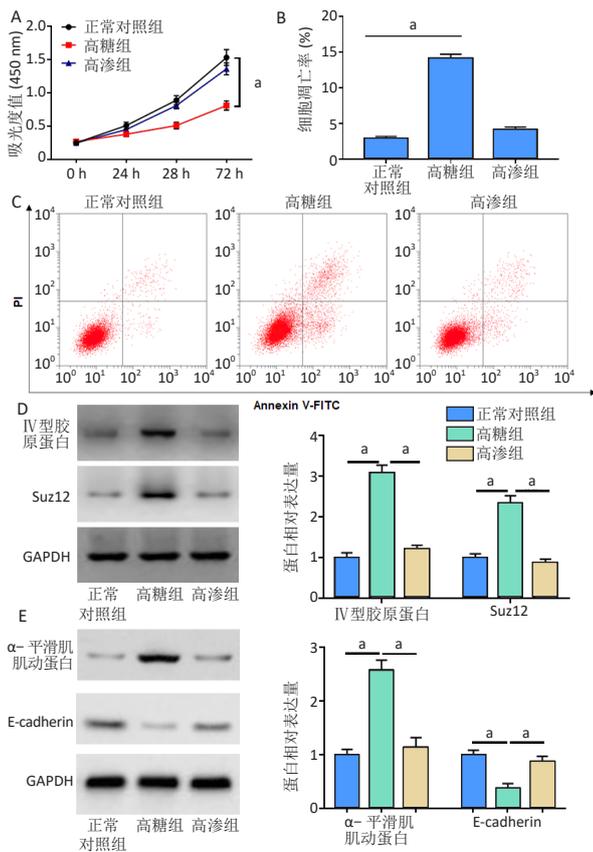
2.2 高糖培养对大鼠肾小管上皮细胞增殖、凋亡以及细胞中 *Suz12*、IV 型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 的蛋白表达水平的影响 与正常对照组相比, 高糖组细胞增殖能力显著减弱 ($P < 0.01$), 细胞凋亡能力增强 ($P < 0.01$), 见图 1A-C。此外, 高糖组细胞中 IV 型胶原蛋白和 *Suz12* 蛋白水平

较正常对照组显著升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 1D; 肾小管上皮细胞上皮间质转化相关标志蛋白 α -平滑肌肌动蛋白表达水平显著升高, E-cadherin 表达水平显著降低, 且差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 1E。与正常对照组相比, 高渗组的细胞增殖、凋亡能力以及细胞中 Suz12、IV 型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 蛋白表达水平无明显变化, 排除了高糖组葡萄糖高浓度对细胞功能的影响存在高渗因素。

2.3 干扰 Suz12 表达对大鼠肾小管上皮细胞增殖、凋亡以及 IV 型胶原蛋白, α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 表达水平的影响 与高糖 +NC siRNA 组相比, 高糖 +Suz12 siRNA 组 Suz12 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 说明 Suz12 siRNA 的干扰效率良好; 高糖 +Suz12 siRNA 组中 IV 型胶原蛋白的蛋白相对表达较高糖 +NC siRNA 组显著降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 2A-C。此外, 与高糖 +NC siRNA 组相比, 高糖 +Suz12 siRNA 组细胞增殖能力明显增加, 细胞凋亡率显著降低, 且差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 2D-F。Western blotting 法检测细胞中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 蛋白

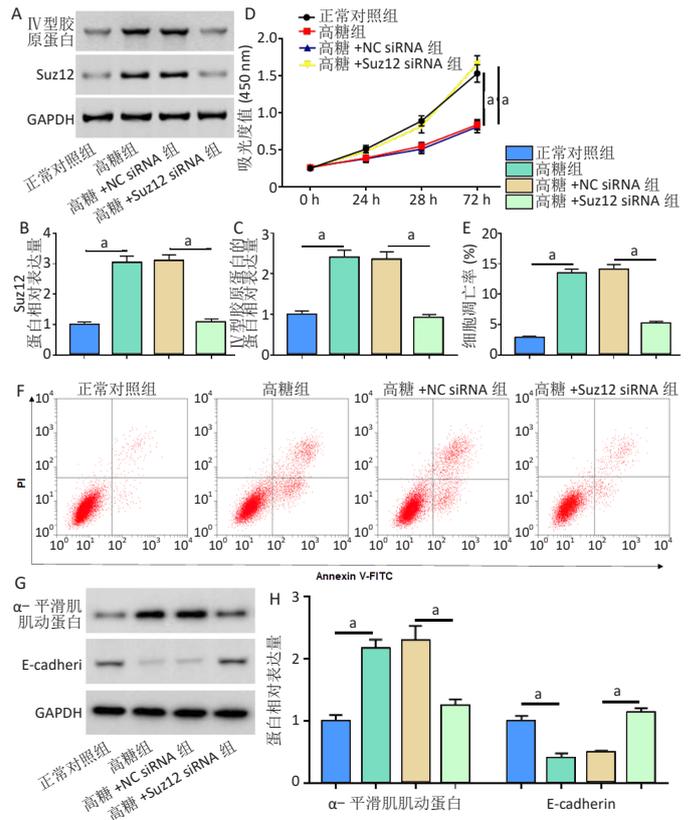
表达水平结果表明, 与高糖 +NC siRNA 组相比, 高糖 +Suz12 siRNA 组细胞中 α -平滑肌肌动蛋白表达水平明显降低, 而 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高, 且差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 2G, H。

2.4 Suz12 对 TIMP3 甲基化水平的影响 染色质免疫共沉淀结果显示 TIMP3 与 Suz12 和 H3K27me3 的结合显著高于 IgG 组 ($P < 0.01$), 见图 3A, 说明 Suz12 可以和 TIMP3 启动子区域结合, 从而在细胞中诱导 H3K27me3 修饰。随后, 通过 MethPrimer(<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 在线软件检测 TIMP3 启动子上游 2 000 bp 核苷酸序列的 CpG 岛分布, 见图 3B。甲基化特异性 PCR 检测细胞中 TIMP3 启动子的甲基化状态。结果表明, 高糖处理可增加 TIMP3 的甲基化水平, 而干扰 Suz12 表达则降低高糖对 TIMP3 启动子区域甲基化水平的促进作用, 见图 3C。此外, 与正常对照组相比, 高糖组中 TIMP3 蛋白表达水平降低, H3K27me3 表达显著升高, 而高糖 +Suz12 siRNA 组中 TIMP3 表达较高糖 +NC siRNA 组升高, H3K27me3 水平降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 3D-F。



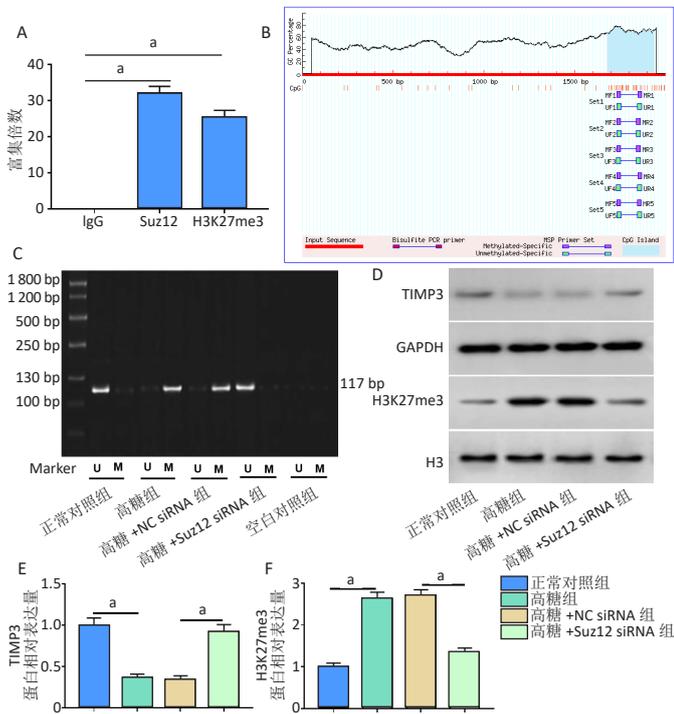
图注: 图 A 示 CCK-8 检测各组肾小管上皮细胞的增殖能力; 图 B, C 示流式细胞仪检测各组肾小管上皮细胞的凋亡能力; 图 D 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 IV 型胶原蛋白和 Suz12 的蛋白表达水平; 图 E 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 的蛋白表达水平。^a $P < 0.01$ 。Suz12: Zeste 基因抑制子基因 12

Figure 1 | The protein expression of type IV collagen, SUZ12, α -smooth muscle actin, E-cadherin and cell proliferation and apoptosis levels in rat renal tubular epithelial cells



图注: 图 A-C 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 IV 型胶原蛋白和 Suz12 的蛋白表达水平; 图 D 示 CCK-8 检测各组肾小管上皮细胞的增殖能力; 图 E, F 示流式细胞仪检测各组肾小管上皮细胞的凋亡能力; 图 G, H 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 的蛋白表达水平。^a $P < 0.01$ 。Suz12: Zeste 基因抑制子基因 12

Figure 2 | Cell proliferation, apoptosis, and the protein expression of type IV collagen, Suz12, α -smooth muscle actin and E-cadherin in rat renal tubular epithelial cells after interference with Suz12 expression

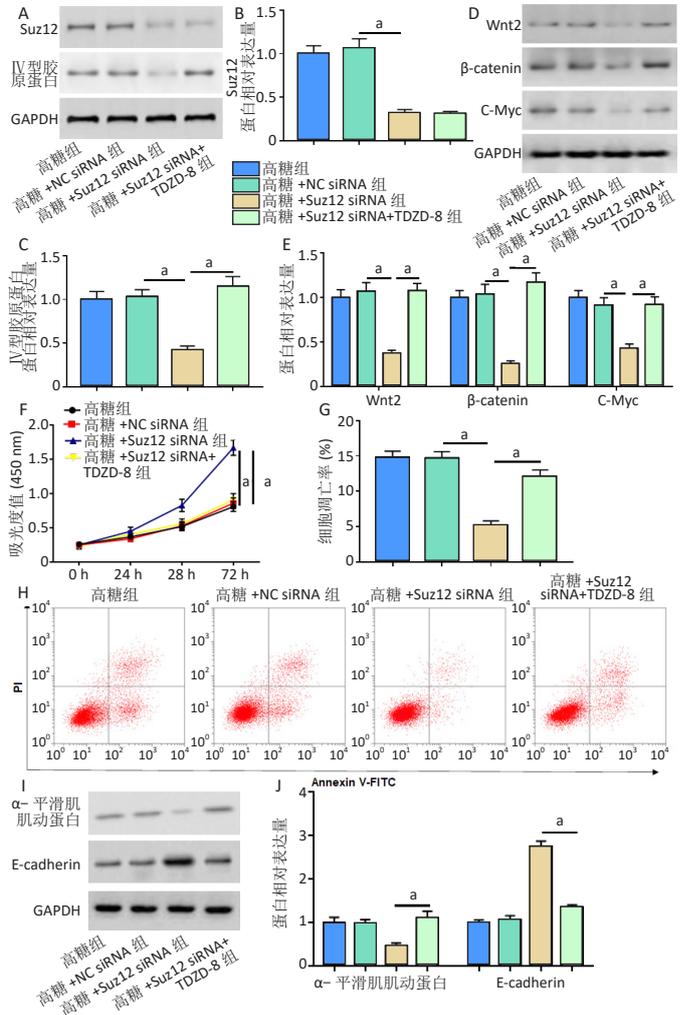


图注 图 A 示染色质免疫共沉淀检测 TIMP3 与 Suz12 和 H3K27me3 的结合; 图 B 示 MethPrimer 在线软件预测 TIMP3 基因启动子区域 CpG 岛的分布; 图 C 示采用亚硫酸氢盐处理的各处理细胞基因组 DNA 对 TIMP3 启动子的 CpG 岛进行 MSP 分析, M 代表甲基化, U 代表未甲基化; 图 D-F 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 TIMP3 和 H3K27me3 的表达水平, $^aP < 0.01$. Suz12: Zeste 基因抑制子基因 12; TIMP3: 金属蛋白酶组织抑制因子 3

图 3 | Suz12 对 TIMP3 甲基化水平的影响
Figure 3 | Effect of Suz12 on TIMP3 methylation level

2.5 通路激活剂 TDZD-8 对 Suz12 诱导细胞损伤的影响 将 Wnt/ β -catenin 通路激活剂 TDZD-8 添加到培养基中诱导激活 Wnt/ β -catenin 通路。结果显示, 与高糖 +Suz12 siRNA 组相比, TDZD-8 处理 Suz12 siRNA 转染的细胞后, IV 型胶原蛋白的蛋白水平增加, 而 Suz12 蛋白水平无明显变化图, 见图 4A-C。高糖 +Suz12 siRNA+TDZD-8 组中通路相关蛋白的表达水平较高糖 +Suz12 siRNA 组显著升高, 且差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 4D, E。此外, 与高糖 +Suz12 siRNA 组相比, 高糖 +Suz12 siRNA+TDZD-8 组细胞增殖能力明显减弱, 凋亡能力显著增强, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 4F-H。Western blotting 法检测细胞中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 蛋白表达水平结果表明, 与高糖 +Suz12 siRNA 组相比, TDZD-8 处理组细胞中 α -平滑肌肌动蛋白表达水平明显升高, 而 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低, 且差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 4I, J。以上说明 Suz12 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进糖尿病肾脏病发展。

2.6 干扰 Suz12 表达后检测糖尿病大鼠血糖、血肌酐、尿素氮、尿总蛋白水平 生化检测结果显示, 与正常对照组相比, 糖尿病模型组大鼠血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白水平均明显增高, Suz12 表达被干扰后血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白水平显著降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见表 1。肾脏石蜡切片苏木精-伊红染色后镜下观察, 可见正常对照



图注: 图 A-C 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 IV 型胶原蛋白和 Suz12 的蛋白表达水平; 图 D, E 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 Wnt2、 β -catenin 和 C-Myc 的蛋白表达水平; 图 F 示 CCK-8 检测各组肾小管上皮细胞的增殖能力; 图 G, H 示流式细胞仪检测各组肾小管上皮细胞的凋亡能力; 图 I, J 示 Western blotting 检测肾小管上皮细胞中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 的蛋白表达水平。 $^aP < 0.01$. Suz12: Zeste 基因抑制子基因 12

图 4 | TDZD-8 处理后干扰 Suz12 表达的肾小管上皮细胞增殖、凋亡以及细胞中 IV 型胶原蛋白、SUZ12、 α -平滑肌肌动蛋白、E-cadherin 和 Wnt 通路相关蛋白的蛋白表达水平

Figure 4 | Cell proliferation, apoptosis, and the protein expression of type IV collagen, SUZ12, α -smooth muscle actin, E-cadherin and Wnt pathway related proteins in Suz12-silenced rat renal tubular epithelial cells after TDZD-8 treatment

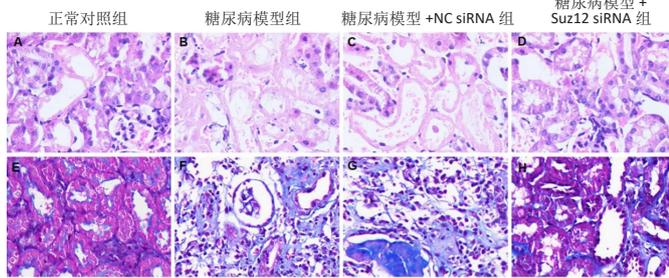
表 1 | 各组大鼠血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 | The changes of blood glucose, serum creatinine, urinary nitrogen and total urinary protein in rats

组别	血糖 (mmol/L)	血肌酐 (μ mol/L)	尿素氮 (mmol/L)	尿总蛋白 (mmol/L)
正常对照组	7.72 \pm 0.83	6.81 \pm 0.23	6.15 \pm 0.32	138.71 \pm 11.96
糖尿病模型组	22.46 \pm 0.71 ^a	11.35 \pm 0.35 ^a	9.78 \pm 0.37 ^a	662.58 \pm 27.44 ^a
糖尿病模型 +NC siRNA 组	22.89 \pm 0.74	12.07 \pm 0.31	9.43 \pm 0.35	657.81 \pm 28.04
糖尿病模型 +Suz12 siRNA 组	9.45 \pm 0.62 ^b	7.11 \pm 0.24 ^b	6.63 \pm 0.35 ^b	200.62 \pm 13.17 ^b

表注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病模型 +NC siRNA 组相比, ^b $P < 0.01$

组切片中肾小管内皮细胞未见增生, 细胞排列整齐, 胞核位于基底部, 足细胞无肥大、增生, 肾小球基底膜未见增厚, 系膜细胞未见增生; 糖尿病模型组中系膜细胞增生, 肾小球

体积增大，肾小管管腔扩张，间质有炎症细胞浸润，Masson染色镜下观察与正常对照组相比，糖尿病组肾小管间质有明显的胶原沉积；而 Suz12 siRNA 干预后糖尿病大鼠肾脏纤维沉积减少，间质炎症细胞浸润减弱，见图 5。



图注：图 A-D 为苏木精 - 伊红染色；E-H 为 Masson 染色

图 5 | 苏木精 - 伊红和 Masson 染色检测各组大鼠肾组织形态学变化 (×400)

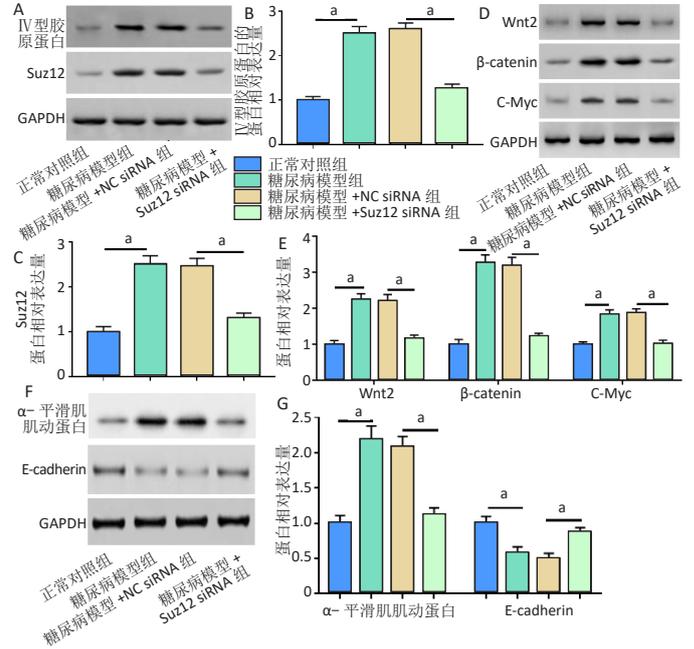
Figure 5 | Histomorphological changes of the rat kidney detected by hematoxylin-eosin and Masson staining (×400)

2.7 干扰 Suz12 对大鼠肾组织中 IV 型胶原蛋白、Suz12 以及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达的影响 与正常对照组相比，糖尿病模型组大鼠肾脏组织中 IV 型胶原蛋白、Suz12 和 Wnt/ β -catenin 通路蛋白 (Wnt2、 β -catenin 和 c-Myc) 的表达水平明显升高，而糖尿病模型 + Suz12 siRNA 组中 IV 型胶原蛋白、Suz12 Wnt2、 β -catenin 和 c-Myc 表达水平较糖尿病模型 + NC siRNA 组显著降低，差异有显著性意义 ($P < 0.01$)，见图 6A-E。此外，Western blotting 实验结果还显示，糖尿病模型组大鼠肾组织中 α -SAM 蛋白表达水平明显升高，E-cadherin 的蛋白表达水平明显降低；而干扰 Suz12 后，大鼠肾组织中的 α -SAM 和 E-cadherin 的蛋白表达水平表现出相反的结果，且差异有显著性意义 ($P < 0.01$)，见图 6F, G。

3 讨论 Discussion

近几年，糖尿病肾脏病的发病率不断上升是全球终末期肾脏疾病的主要原因之一^[9]，因此，研究糖尿病肾脏病的发病机制和相应的治疗措施十分重要。在这项研究中，揭示了 Suz12 在糖尿病肾脏病中的致病作用以及潜在分子机制。

有研究表明，组蛋白修饰在肾脏疾病中发挥重要作用。在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型，糖尿病 db/db 小鼠和糖尿病患者的肾活检组织中，组蛋白去乙酰化酶 HDAC4 表达增加。通过慢病毒介导的 HDAC4 基因沉默后，发现糖尿病大鼠的肾损伤程度明显减轻^[10]。组蛋白甲基转移酶 (EZH2) 和 H3K27me3 在糖尿病 C57BL/6J 小鼠肾组织和转化生长因子 β 1 诱导的肾小管上皮细胞中高表达，用 siRNA EZH2 干预后可以减轻小鼠肾脏纤维化和肾小管上皮细胞发生间充质细胞转化^[11]。此外，转化生长因子 β 1 可上调糖尿病大鼠肾小管上皮细胞中 p21 基因的表达，且与 H3K4me1/2/3 相关的染色质标记增加呈正相关。转化生长因子 β 1 还可提高 H3K4 甲基转移酶 (HMT)SET7/9 向 p21 基因启动子的募集，用 SET7/9 siRNA 干预可显著消除转化生长因子 β 1 诱导的 p21 基因表达^[12]。



图注：图 A-C 示 Western blotting 检测肾脏组织中 IV 型胶原蛋白和 Suz12 的蛋白表达水平；图 D, E 示 Western blotting 检测肾脏组织中 Wnt2、 β -catenin 和 c-Myc 的蛋白表达水平；图 F, G 示 Western blotting 检测肾脏组织中 α -平滑肌肌动蛋白和 E-cadherin 的蛋白表达水平。^a $P < 0.01$ 。Suz12: Zeste 基因抑制子基因 12

图 6 | 各组大鼠肾脏组织中 IV 型胶原蛋白、Suz12、Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白以及 α -平滑肌肌动蛋白、E-cadherin 蛋白表达水平

Figure 6 | The expression levels of type IV collagen, Suz12, α -smooth muscle actin, E-cadherin, and Wnt/ β -catenin pathway related proteins in rat kidney tissue

Suz12 是最近发现的 Polycomb 组蛋白甲基转移酶，它与 EZH2 和 EED 一起形成不同的 Polycomb 抑制复合物 (PRC2/3)，这些复合物包含由 EZH2 SET 结构域指定的组蛋白 H3 赖氨酸 (K)27/9 和组蛋白 H1 K26 甲基转移酶活性^[13]。此次研究发现 Suz12 在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾脏组织和高糖刺激的大鼠肾小管上皮细胞中高表达；Suz12 siRNA 干预后细胞活力增加，细胞凋亡率减少，IV 型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达下调以及 E-cadherin 蛋白表达上调。IV 型胶原蛋白存在于间质基质与基底膜之间，在肾纤维化的肾脏组织中 IV 型胶原蛋白表达上调，可用于描述慢性肾脏病进展过程中的病理改变^[14]。苏木精 - 伊红、Masson 染色发现 Suz12 siRNA 干预后糖尿病大鼠肾脏纤维沉积减少，间质炎症细胞浸润减弱。血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白被认为是微血管并发症的主要标志，Suz12 siRNA 干预后血糖、血肌酐、尿素氮和尿总蛋白含量均减少，说明大鼠肾损伤得到缓解。

此次研究发现 Suz12 可与 TIMP3 启动子区域结合，在细胞中诱导 TIMP3 H3K27me3 修饰，抑制 TIMP3 表达。据报道糖尿病肾脏病的特征在于肾小管间质纤维化，肾小球基底膜增厚和肾小球系膜扩张，主要是由于细胞外基质的积累^[15]，而细胞外基质周转受金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制剂活性的调节^[16-17]。TIMP3 是基质金属蛋白酶的内源性抑制剂，在细胞外基质重塑中起着重要作用。临床研究发现在糖尿病

患者中, TIMP3 在肾脏中异常低表达^[18]。KASSIRI 等^[19]研究表明, 小鼠中 TIMP3 的缺失提示间质性肾炎和心肌病以及纤维化, 恶化糖尿病性心肌病和肾病。XU 等^[20]研究表明, 组蛋白甲基转移酶 EZH2 的 RNA 干扰和药理学抑制可降低组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化水平, 并增加 TIMP3 表达水平, 进而缓解肺癌进展。此外, Suz12 缺陷型胚胎显示出二甲基和三甲基化 H3K27 的特定损失, 表明 Suz12 对体内 EZH2 活性至关重要^[21]。因此, 推测 Suz12 可能通过增加 EZH2 活性促进 TIMP3 甲基化水平, 加速糖尿病大鼠肾损伤。

研究表明 Wnt 蛋白在肾脏器官相关疾病的发生中发挥关键作用, Wnt 基因敲除与肾功能的发育异常相关^[22]。此外, Wnt/ β -catenin 信号通路在不同的肾脏相关疾病例如肾纤维化、急性肾功能衰竭、肾缺血性损伤以及糖尿病肾病中也至关重要^[23-26]。有研究显示, Wnt/ β -catenin 通路蛋白 Wnt4、 β -catenin 和 p-GSK-3 β 在糖尿病肾病中高表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可促进肾小管上皮细胞增殖, 减少细胞凋亡^[8]。此外, Wnt/ β -catenin 信号传导在糖尿病肾病的发病机制, 包括足细胞损伤、肾小球系膜细胞功能障碍和细胞外基质沉积^[27]。此次研究结果同样显示, Wnt/ β -catenin 通路蛋白 Wnt2、 β -catenin 和 c-Myc 在糖尿病大鼠肾组织和高糖刺激的大鼠肾小管上皮细胞中高表达, 使用 Suz12 siRNA 干预后通路蛋白表达显著下调, 而使用 Wnt/ β -catenin 通路激活剂 TDZD-8 干预转染 Suz12 siRNA 的细胞后, 通路相关蛋白表达明显增加, 细胞活力增强, 凋亡率降低。

综上所述, 在链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型和高糖刺激的大鼠肾小管上皮细胞中, Suz12 表达上调。推测其可能通过诱导 TIMP3 甲基化激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 进而参与调控糖尿病肾脏病的进程。

致谢: 对主持此次研究的河南中医药大学第三附属医院表示感谢。

作者贡献: 徐江雁提供资金支持并负责实验设计, 赵璐负责实验实施和论文撰写, 赵逸菲负责资料收集, 高达负责指标测定, 刘艳芳负责数据统计分析, 付婷婷负责论文审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

[1] LU Y, LIU D, FENG Q, et al. Diabetic Nephropathy: Perspective on Extracellular Vesicles. *Front Immunol*. 2020;11(1):943.
[2] 张宝文, 雷香丽, 李瑾娜, 等. miR-21-5p 靶向调控 TIMP3 抑制 2 型糖尿病肾病小鼠肾脏系膜细胞增殖及细胞外基质堆积 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2020,58(7):7-14.
[3] SHINOJIMA T, YU Q, HUANG SK, et al. Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer. *Epigenetics*. 2012;7(11): 1279-1289.

[4] CYRUS S, BURKARDT D, WEAVER DD, et al. PRC2-complex related dysfunction in overgrowth syndromes: A review of EZH2, EED, and SUZ12 and their syndromic phenotypes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2019;181(4):519-531.
[5] ZENG J, XIANG W, ZHANG Y, et al. Ubiquitous expressed transcript promotes tumorigenesis by acting as a positive modulator of the polycomb repressive complex 2 in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1):874.
[6] METSUYANIM S, PODE-SHAKKED N, SCHMIDT-OTT KM, et al. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem Cells*. 2008; 26(7):1808-1817.
[7] XIAO L, WANG M, YANG S, et al. A glimpse of the pathogenetic mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling in diabetic nephropathy. *Biomed Res Int*. 2013;2013(1):987064.
[8] ZHANG RD, SHI M. Occurrence and development of diabetic nephropathy caused by CD63 by inhibiting Wnt- β -catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(1):284-294.
[9] RAYEGO-MATEOS S, MORGADO-PASCUAL JL, OPAZO-RÍOS L, et al. Pathogenic Pathways and Therapeutic Approaches Targeting Inflammation in Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3798.
[10] WANG X, LIU J, ZHEN J, et al. Histone deacetylase 4 selectively contributes to podocyte injury in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2014;86(4):712-725.
[11] RUAN Y, ZHANG Y, ZHAO J, et al. EZH2 promotes development and progression of diabetic nephropathy. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2020;36(3):212-219.
[12] GUO Q, LI X, HAN H, et al. Histone Lysine Methylation in TGF- β 1 Mediated p21 Gene Expression in Rat Mesangial Cells. *Biomed Res Int*. 2016;2016(1):6927234.
[13] HSU JH, RASMUSSEN T, ROBINSON J, et al. EED-Targeted PROTACs Degrade EED, EZH2, and SUZ12 in the PRC2 Complex. *Cell Chem Biol*. 2020;27(1):41-46.e17.
[14] YANG Q, CHEN HY, WANG JN, et al. Alcohol promotes renal fibrosis by activating Nox2/4-mediated DNA methylation of Smad7. *Clin Sci (Lond)*. 2020;134(2):103-122.
[15] QIAO S, LIU R, LV C, et al. Berginin impedes the generation of extracellular matrix in glomerular mesangial cells and ameliorates diabetic nephropathy in mice by inhibiting oxidative stress via the mTOR/ β -Trcp/Nrf2 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2019;145(1):118-135.
[16] SØRENSEN J, SUBHI Y, MOLBECH CR, et al. Plasma Levels of Matrix Metalloprotease MMP-9 and Tissue Inhibitor TIMP-1 in Caucasian Patients with Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Vision (Basel)*. 2020;4(2):27.
[17] LARONHA H, CARPINTEIRO I, PORTUGAL J, et al. Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition. *Biomolecules*. 2020;10(5):717.
[18] WANG L, LI H. MiR-770-5p facilitates podocyte apoptosis and inflammation in diabetic nephropathy by targeting TIMP3. *Biosci Rep*. 2020;40(4):BSR20193653.
[19] KASSIRI Z, OUDIT GY, KANDALAM V, et al. Loss of TIMP3 enhances interstitial nephritis and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1223-1235.
[20] XU C, HOU Z, ZHAN P, et al. EZH2 regulates cancer cell migration through repressing TIMP-3 in non-small cell lung cancer. *Med Oncol*. 2013;30(4):713.
[21] JIAO L, SHUBBAR M, YANG X, et al. A partially disordered region connects gene repression and activation functions of EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(29):16992-17002.
[22] WANG Y, ZHOU CJ, LIU Y. Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;153(1):181-207.
[23] MIAO J, LIU J, NIU J, et al. Wnt/ β -catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*. 2019;18(5):e13004.
[24] HUFFSTATER T, MERRYMAN WD, GEWIN LS. Wnt/ β -Catenin in Acute Kidney Injury and Progression to Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol*. 2020;40(2):126-137.
[25] DONG Q, JIE Y, MA J, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway promotes renal ischemia-reperfusion injury through inducing oxidative stress and inflammation response. *J Recept Signal Transduct Res*. 2021;41(1):15-18.
[26] 张洋, 黄学宽, 沈清, 等. 复肾功方对慢性肾衰竭大鼠 Wnt/ β -catenin 信号途径的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020,26(24):96-102.
[27] TUNG CW, HSU YC, SHIH YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2018; 23 Suppl 4(1):32-37.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)