

TYROBP 通过抑制 ERK 通路减缓糖尿病肾病的进展

李 亮^{1,2}, 黄 杰³, 王心灵^{1,2}, 闫丽平^{1,2}, 於慧清^{1,2}, 李治国^{1,2}

(¹ 华北理工大学公共卫生学院, 唐山 063210; ² 河北省器官纤维化重点实验室, 唐山 063210;

³ 华北理工大学附属医院泌尿外科, 唐山 063210)

摘要 **目的** 探讨 TYRO 蛋白酪氨酸激酶结合蛋白(TYROBP)是否通过细胞外信号调节激酶(ERK)通路影响糖尿病肾病(DKD)的进展。**方法** 生物信息分析鉴定 DKD 关键基因,免疫组织化学染色和实时定量 PCR(qPCR)验证 DKD 小鼠模型以及高糖(HG)刺激的 NRK-52E 细胞中 TYROBP 表达水平。通过慢病毒转染,构建稳定过表达/沉默 TYROBP 及其空载(ev)/随机序列(ss)对照的 NRK-52E 细胞模型,分别采用 5.5 mmol/L 葡萄糖浓度和 30.0 mmol/L 葡萄糖浓度干预 72 h,模拟正常糖(NG)、HG 环境;将含有终浓度为 3.5 μ mol/L FR180204 的 HG 培养基作为 ERK 抑制剂干预;实验分为 7 组:ev + NG 组、ev + HG 组、oe-TYROBP + HG 组、ss + NG 组、ss + HG 组、sh-TYROBP + HG 组、sh-TYROBP + HG + ERK 抑制剂组。Western blot 检测各组细胞中磷酸化细胞外信号调节激酶/细胞外信号调节激酶(p-ERK/ERK),凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax),上皮间质转化(EMT)相关蛋白钙黏蛋白(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达水平。通过四甲基罗丹明乙酯(TMRE)以及异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)染色,使用流式细胞术检测细胞线粒体膜电位及凋亡水平。**结果** 生物信息分析 TYROBP 作为 DKD 的关键基因,体内以及体外验证 DKD 模型中 TYROBP mRNA 水平增加。HG 模型结果显示,与 ev + NG/ss + NG 组比较,ev + HG/ss + HG 组 p-ERK/ERK 表达增加,线粒体膜电位降低,凋亡水平增加,EMT 水平增加。扰动 TYROBP 的 NRK-52E 细胞模型结果显示,与 ev + HG 组比较,oe-TYROBP + HG 组 p-ERK/ERK 表达降低($P < 0.01$),线粒体膜电位增加($P < 0.05$),细胞凋亡水平减少($P < 0.001$),EMT 水平降低;与 ss + HG 比较,sh-TYROBP + HG 组 p-ERK/ERK 表达增加($P < 0.001$),线粒体膜电位降低($P < 0.01$),凋亡水平增加($P < 0.001$),EMT 水平增加;与 sh-TYROBP + HG 比较 sh-TYROBP + HG + ERK 抑制剂组中 p-ERK/ERK 表达降低($P < 0.01$),线粒体膜电位增加($P < 0.001$),细胞凋亡水平减少($P < 0.001$),EMT 水平降低。**结论** TYROBP 可能通过抑制 ERK 信号通路,降低 HG 情况下 NRK-52E 细胞凋亡以及 EMT 相关蛋白的水平,增加肾小管上皮细胞线粒体膜电位水平继而抑制 DKD 的进展。

关键词 糖尿病肾病;肾小管细胞;凋亡;上皮间质转化;TYROBP;ERK

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2026-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.006

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的严重并发症,缺乏有效的治疗手段,探讨其机制有助于寻找新的治疗靶点^[1]。生物信息学分析提示 TYRO 蛋白酪氨酸激酶结合蛋白(TYRO protein tyrosine kinase-binding protein, TYROBP)可能是 DKD 肾小管发病中的关键基因^[2]。TYROBP 作为一种细胞表面分子,广泛分布于多种细胞类型,它通过调节细胞表面受体的活性,参与调控细胞的增殖、分化和凋亡过程^[3]。研究^[4]表明,TYROBP 能够调控其下游的细胞外调节蛋白激酶(extracellular sig-

nal-regulated kinase, ERK)信号通路,ERK 是细胞生长、分化和凋亡等生物学过程中的关键调节因子。肾小管上皮细胞凋亡以及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是 DKD 的重要特征之一^[5-6],ERK 信号通路的异常激活与肾小管上皮细胞凋亡及 EMT 紧密相关^[7]。在 DKD 肾小管细胞中,TYROBP 的表达水平发生了显著变化^[8],但其在 DKD 中的具体作用机制及其是否通过 ERK 信号通路调节肾小管上皮细胞的凋亡及 EMT 也尚属未知。该研究旨在探讨 TYROBP 在 DKD 进展过程中的影响,以及其是否通过调控 ERK 信号通路影响肾小管上皮细胞的凋亡和 EMT。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞 NRK-52E、HEK-293T 细胞购自中国

2025-09-30 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2020209243);中央引导地方科技发展资金项目(编号:236Z7712G)

作者简介:李 亮,男,硕士研究生;

李治国,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: lzg1017@163.com

科学院细胞库(北京),分别采用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的正常糖(normal glucose, NG)(5.5 mol/L 葡萄糖)、高糖(high glucose, HG)(30.0 mol/L 葡萄糖)DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.1.2 动物 SPF 级 5 周龄 DB/DB DKD 模型小鼠 6 只,体质量(28.09 ± 2.07)g;对照组为 SPF 级 5 周龄野生型 C57BL/6 小鼠 6 只,体质量(19.93 ± 1.01)g,均购于北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2019-0008。所有小鼠均饲养于 SPF 环境(22 ~ 25 ℃,相对湿度 50% ~ 60%),12 h/12 h 光暗循环。本实验经华北理工大学实验动物福利伦理委员会批准(伦理批号:2022-SY-039)。

1.1.3 实验材料 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自德国 PAN Seratech 公司;胰酶购自北京索莱宝科技有限公司;100 × 青链霉素溶液购自苏州新赛美生物科技有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京兰杰柯科技有限公司;Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂购自美国 BD 公司;四甲基罗丹明乙酯(TetramethylrhodamineEthylEster, TMRE)购自武汉艾美捷科技有限公司;ERK 抑制剂 FR180204、嘌呤霉素购自上海 MedChemExpress LLC 公司;TYROBP 小鼠引物、BeyoPEI™ 转染试剂、polybrene 购自上海碧云天生物科技有限公司;RIPA 裂解液、cocktail 蛋白酶抑制剂购自美国 Roche 公司;鼠抗 β-Tubulin 抗体、兔抗细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)抗体、兔抗磷酸化 ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2)抗体、兔抗 B 细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、兔抗 Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体、兔抗 E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、兔抗 α-平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α-SMA)抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司;兔抗 TYROBP 抗体、电化学检测发光(ECL)试剂盒购自(北京)博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中获得人类 DKD 和正常肾组织的转录组数据。使用 R 语言中 Limma 包分别对数据集 GSE104954、GSE30529 归一化处理,对基因注释文件筛选差异表达基因(|log₂ FC| >

1.5),FDR 校正后的 $P < 0.05$ 作为筛选标准),取在 2 个数据集中均存在的差异基因,导入 STRING(<https://string-db.Org>)数据库构建蛋白互作网络,通过 Cytoscape 中 cytoHubba 插件查找蛋白质相互作用网络模块。

1.2.2 实时定量 PCR(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测 DKD 模型 TYROBP mRNA 表达情况 使用总 RNA 提取试剂盒,按说明书操作提取细胞及动物肾脏总 RNA,使用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂说明书进行逆转录和扩增,β-actin 为内参,结果采用 2^{-ΔΔC_T}方法计算分析。小鼠 β-actin 引物序列:(F) 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG-3', (R): 5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'; TYROBP 大鼠引物序列:(F) 5'-TTCTGTTTCCTTCCTGTCCTCCTG-3', (R) 5'-ATTCCGATCCTGGGTAATTGTCAG-3'; 大鼠 β-actin 引物序列:(F) 5'-TACAACCTCCTTG-CAGCTCC-3', (R): 5'-GGATCTTCATGAGGTAGT-CAGTC-3'。

1.2.3 免疫组织化学检测 TYROBP 表达 取小鼠肾组织,经 4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水后石蜡包埋、切片,将切片脱蜡、水化,0.01 mmol/L 的枸橼酸钠修复 3 min。内源性过氧化物酶封闭 15 min 加入 TYROBP 一抗(1: 300)4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后,与抗鼠/抗兔 IgG 的孵育缓冲液 37 ℃ 孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用深圳市生强科技有限公司玻片扫描系统采集 12 只小鼠肾脏图片,每个切片取 3 个视野(×200)。Image J 计算棕黄色区域面积,并将其平均值作为一个动物样本的数据。

1.2.4 构建稳定过表达及沉默 TYROBP 细胞模型

将 TYROBP 编码区序列导入至 pLVX-Puro 载体,构建过表 TYROBP 基因的质粒,将未作处理的 pLVX-Puro 载体作为过表达组的空载(empty vector, ev)对照;将 TYROBP 沉默序列(5'-CCGGAAGTAT-ACAGTGACCTCAACACTCGAGTGTGAGGTCACTG-TATACTTTTTTTT-3')和随机序列(scrambled sequence, ss)对照(5'-TGACTTCATAAGCGCATGCT-TCAAGAGAGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTC-3')分别克隆至 pLKO.1-Puro 载体,构建沉默 TYROBP 及 ss 对照慢病毒质粒。将提取纯化后的质粒分别与包装质粒 PSPAX2、PMD2G 和转染脂质体 Beyo-PEI™ 混合,转染至 293T 细胞,制备 ev 对照、过表达 TYROBP、ss 对照及沉默 TYROBP 的慢病毒。将制

备的慢病毒与含 10 ng/mL polybrene 的培养基 1 : 1 混合,分别加入 NRK-52E 细胞中,感染 24 h 后,更换新鲜培养基。转染 72 h 后加入含 1 μ g/mL 嘌呤霉素连续筛选 5 d,获得感染相应慢病毒的细胞株。

1.2.5 实验分组 通过慢病毒转染,构建稳定过表达/沉默 TYROBP 及其 ev/ss 对照的 NRK-52E 细胞模型,分别采用 5.5 mmol/L 葡萄糖浓度和 30.0 mmol/L 葡萄糖浓度干预 72 h,模拟正常糖(normal glucose, NG)、高糖(high glucose, HG)环境;将含有终浓度为 3.5 μ mol/L FR180204 的 HG 培养基作为 ERK 抑制剂干预;细胞实验分组:将空载 pLVX-Puro 载体制成的慢病毒感染的细胞作为 ev 组,导入 ss 的 pLKO.1-Puro 载体制成的慢病毒所感染的细胞作为 ss 组,导入 TYROBP 编码区序列的 pLVX-Puro 载体所制成的慢病毒感染的细胞作为过表达 TYROBP 组,导入 TYROBP 沉默序列的 pLKO.1-Puro 载体所制成的慢病毒感染的细胞作为沉默 TYROBP 组;实验分为 7 组:ev + NG 组(ev 病毒感染细胞,NG 培养 72 h)、ev + HG 组(ev 病毒感染细胞,HG 培养 72 h)、oe-TYROBP + HG 组(过表达 TYROBP 病毒感染细胞,HG 培养 72 h)、ss + NG(ss 病毒感染细胞,NG 培养 72 h)、ss + HG(ss 病毒感染细胞,HG 培养 72 h)、sh-TYROBP + HG 组(沉默 TYROBP 病毒感染细胞,HG 培养 72 h)、ERK 抑制剂组(沉默 TYROBP 病毒感染细胞 + ERK 抑制剂,HG 培养 72 h)。动物分组与处理:6 只 5 周龄野生型 C57BL/6 小鼠作为正常对照组(WT 组),6 只 5 周龄自发性糖尿病肾病 DB/DB 小鼠作为疾病模型组(DB/DB 组)。两组小鼠均在标准实验室条件下饲养,自由摄食饮水,未给予任何特殊药物干预。每周记录小鼠体质量和血糖水平以确认模型成功成立。

1.2.6 Western blot 检测各组细胞 ERK 及凋亡相关蛋白表达 Western blot 检测各组细胞中 p-ERK/ERK、Bcl-2、Bax、E-cadherin、 α -SMA 蛋白表达水平,使用含 cocktail 的单去污剂 RIPA 裂解液裂解细胞,超声破碎 15 s,冰上放置 20 min。Bradford 法测量蛋白样品浓度。取 15 μ g 蛋白变性后,经 4% ~ 12% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳分离。半干转印至 NC 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后一抗(1 : 1 000)室温孵育 1.5 h。TSBT 洗涤 3 次去除残留一抗。二抗室温孵育 2 h,TSBT 洗涤 3 次去除残留二抗。采用 ECL 法显示条带,使用成像系统采集图像。Image J 获取条带灰度值进行分析。

1.2.7 TMRE 检测线粒体膜电位 消化离心收集

处理细胞至离心管中,向其中加入终浓度为 100 nmol/L 的 TMRE,37 $^{\circ}$ C 的避光孵育 30 min。孵育结束后室温下 800 r/min 离心 5 min 清洗并收集细胞,1 h 内使用贝克曼 CytoFLEX 流式细胞仪检测。FlowJo 软件获取平均荧光强度。

1.2.8 Annex V-FITC/PI 检测细胞凋亡 消化离心收集处理细胞至离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤细胞 2 次。加入 Annex V-FITC 染色 15 min,上机检测前 3 min 左右加入 PI 染色。30 min 内贝克曼 CytoFLEX 流式细胞仪检测。FlowJo 软件获取凋亡指数。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计学分析,结果用均数 $\pm$ 标准差表示,分析两组间差异采用独立样本 t 检验,多组间分析采用单因素方差分析(ANOVA),多组间的两两比较采用 Tukey 多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DKD 患者、小鼠和 HG 环境下 NRK-52E 细胞 TYROBP 表达情况 生物信息学分析提示 TYROBP 是 2 个数据集中均差异表达基因构建蛋白质相互作用网络模块的核心基因(图 1A),TYROBP 基因在数据集 GES104954 ($t = 4.308, P < 0.001$),GES30529 ($t = 4.137, P < 0.001$) DKD 患者中表达增加(图 1B、C);免疫组织化学染色显示,TYROBP 的表达主要集中在肾小管区域(图 1D)与 WT 组比较,DB/DB 组小鼠 TYROBP 表达水平增加($t = 9.575, P < 0.001$)(图 1G);HG 环境下 NRK-52E 细胞 TYROBP mRNA 水平增加($t = 4.414, P < 0.01$)(图 1E),在 DB/DB 小鼠模型中,与 WT 组比较,TYROBP mRNA 水平增加($t = 23.39, P < 0.001$)(图 1F)。

2.2 构建扰动 TYROBP 基因细胞模型 qPCR 分析结果显示,与 ev 对照组比较,过表达 TYROBP 组 mRNA 水平增加($t = 18.34, P < 0.0001$)(图 2A);与 ss 对照组比较,沉默 TYROBP 组中 TYROBP mRNA 水平降低($t = 8.431, P < 0.001$)(图 3A)。结果提示,成功构建稳定过表达及沉默 TYROBP 的 NRK-52E 细胞模型。

2.3 过表达 TYROBP 对 ERK 及肾小管细胞损伤的影响 Western blot 结果显示,与 ev + NG 组比较,ev + HG 组 E-ca 蛋白表达降低($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达升高($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达降低

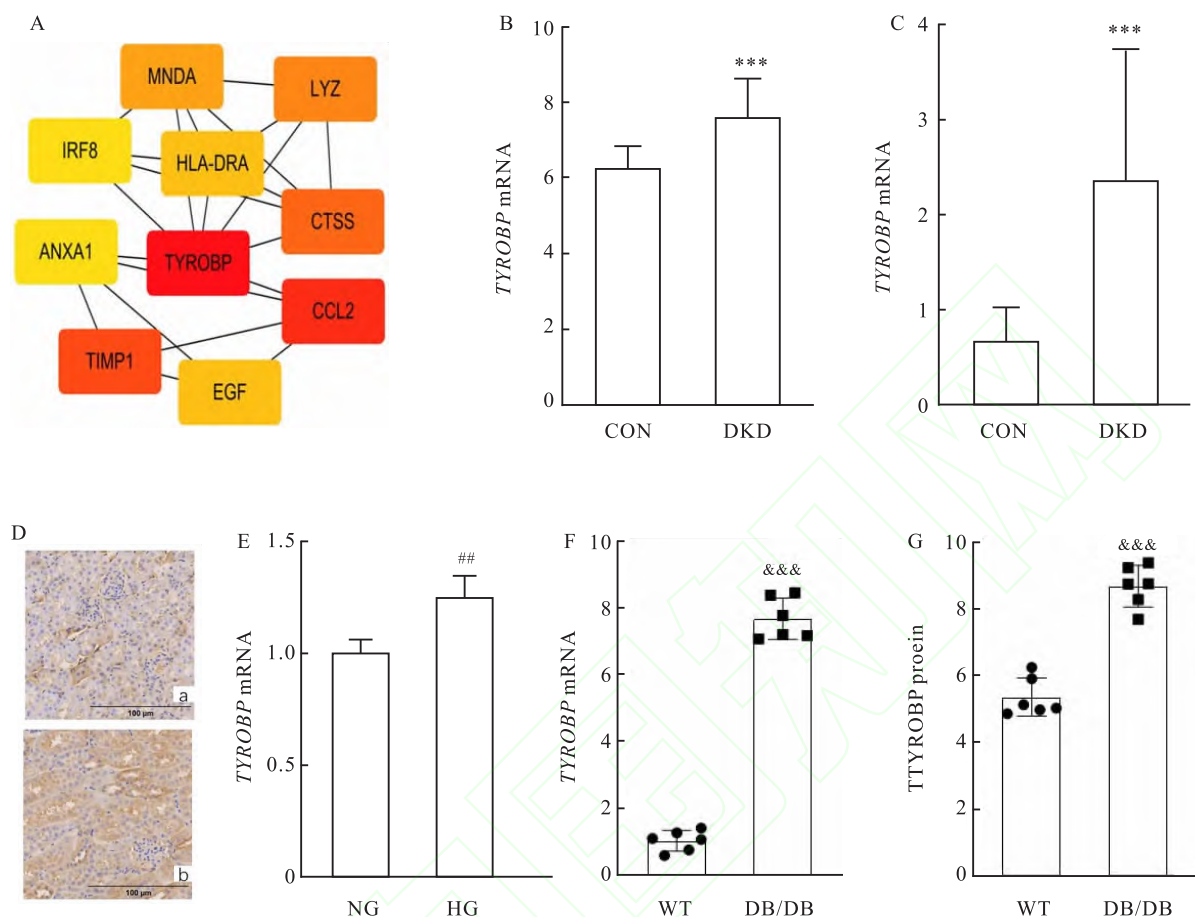


图1 DKD患者、小鼠和HG环境下的NRK-52E细胞TYROBP表达情况

Fig. 1 TYROBP expression in DKD patients, mice, and high glucose-treated NRK-52E cells

A: TYROBP was identified as a key gene in diabetic nephropathy through screening of GEO datasets GSE104954 and GSE30529; B, C: Relative mRNA expression levels of TYROBP in datasets GSE104954 and GSE30529; D: Immunohistochemical staining ($\times 200$) showing the localization and expression levels of TYROBP protein in the kidneys of wild-type (a) and DB/DB (b) model mice; E: qPCR analysis of the relative expression of TYROBP in NRK-52E cells under high glucose conditions; NG: 5.5 mmol/L glucose; HG: 30.0 mmol/L glucose; F: qPCR analysis of the relative expression of TYROBP in the kidneys of DB/DB model mice; G: Statistical analysis of immunohistochemical staining; WT: Wild-type C57BL/6 mice; DB/DB: diabetic nephropathy model mice; *** $P < 0.001$ vs CON group; ## $P < 0.01$ vs NG group; &&& $P < 0.001$ vs WT group.

($P < 0.01$), Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), p-ERK/ERK 蛋白表达升高 ($P < 0.01$) (图 2B、E); 与 ev + HG 组比较, oe-TYROBP + HG 组 E-ca 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), p-ERK/ERK 蛋白表达降低 ($P < 0.01$) (图 2B、E)。TMRE 与 Annexin V-FITC/PI 检测结果显示, 与 ev + NG 组比较, ev + HG 组线粒体膜电位降低 ($P < 0.001$) (图 2C、F), 凋亡水平升高 ($P < 0.001$) (图 2D、G); 与 ev + HG 组比较, oe-TYROBP + HG 组线粒体膜电位升高 ($P < 0.05$) (图 2C、F), 凋亡水平降低 ($P < 0.001$) (图 2D、G)。

2.4 沉默 TYROBP 对 ERK 及肾小管细胞损伤的

影响 Western blot 结果显示, 与 ss + NG 组比较, ss + HG 组 E-ca 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), p-ERK/ERK 蛋白表达升高 ($P < 0.001$) (图 3B、E); 与 ss + HG 组比较, sh-TYROBP + HG 组 E-ca 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), p-ERK/ERK 蛋白表达升高 ($P < 0.001$) (图 3B、E)。TMRE 与 Annexin V-FITC/PI 检测结果显示, 与 ss + NG 组比较, ss + HG 组线粒体膜电位降低 ($P < 0.001$) (图 3C、F), 凋亡水平升高 ($P < 0.001$) (图 3D、G); 与 ss + HG 组比较, sh-TYROBP + HG 组

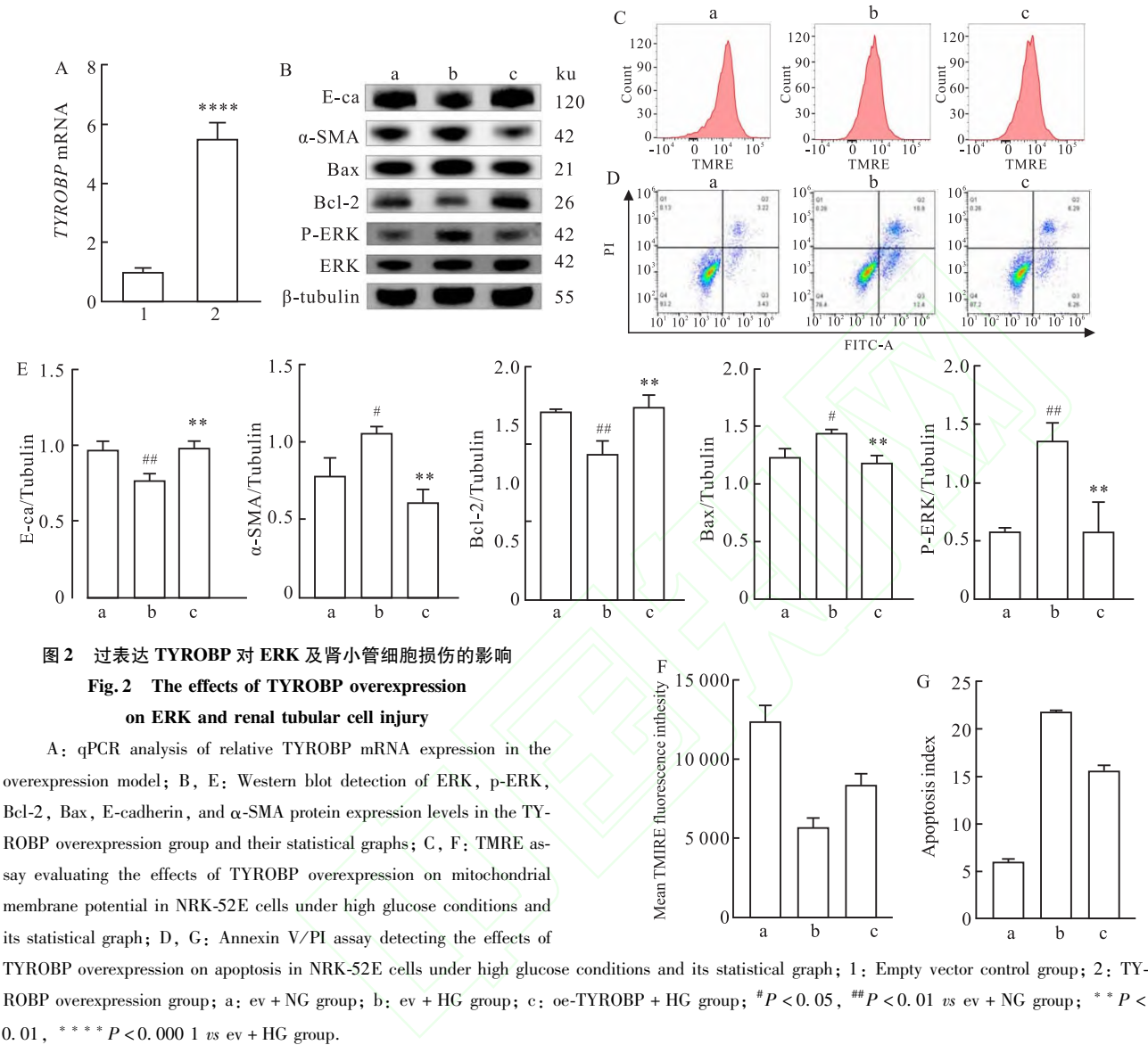


图2 过表达TYROBP对ERK及肾小管细胞损伤的影响

Fig. 2 The effects of TYROBP overexpression on ERK and renal tubular cell injury

A: qPCR analysis of relative TYROBP mRNA expression in the overexpression model; B, E: Western blot detection of ERK, p-ERK, Bcl-2, Bax, E-cadherin, and α -SMA protein expression levels in the TYROBP overexpression group and their statistical graphs; C, F: TMRE assay evaluating the effects of TYROBP overexpression on mitochondrial membrane potential in NRK-52E cells under high glucose conditions and its statistical graph; D, G: Annexin V/PI assay detecting the effects of TYROBP overexpression on apoptosis in NRK-52E cells under high glucose conditions and its statistical graph; 1: Empty vector control group; 2: TYROBP overexpression group; a: ev + NG group; b: ev + HG group; c: oe-TYROBP + HG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs ev + NG group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs ev + HG group.

线粒体膜电位降低(图3C、F)($P < 0.01$),凋亡水平升高($P < 0.001$)(图3D、G)。

2.5 ERK抑制剂对沉默TYROBP诱导的肾小管细胞损伤的影响 Western blot结果显示,与sh-TYROBP + HG组比较,sh-TYROBP + HG + ERK抑制剂组 p-ERK/ERK 蛋白表达降低($t = 4.915, P < 0.01$),FR180204成功阻断了ERK通路;E-ca蛋白表达增加($t = 9.918, P < 0.001$), α -SMA蛋白表达降低($t = 4.504, P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达增加($t = 4.909, P < 0.01$),Bax蛋白表达降低($t = 7.684, P < 0.001$)(图4A、B),TMRE与Annexin V-FITC/PI检测结果显示,与sh-TYROBP + HG组比较,sh-TYROBP + HG + ERK抑制剂组线粒体膜电位增加($t = 9.022, P < 0.001$)(图4C、E),凋亡水平减少($t = 8.862, P < 0.001$)(图4D、F)。

3 讨论

DKD是糖尿病的严重并发症,是导致肾衰竭的重要原因^[9]。目前针对DKD的治疗主要依靠控制患者血糖和血压,给予肾素-血管紧张素系统阻滞剂降低尿蛋白排泄率。而近年来钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂和盐皮质激素阻滞剂的应用能减缓部分患者DKD的进展^[10-11],揭示对DKD的发病机制进行进一步探索,可能为有效防治DKD提供新的思路。

前期生物信息学分析发现TYROBP的表达水平在DKD患者肾脏及HG刺激的HK-2细胞中发生了显著变化^[8]。本研究对GSE104954、GSE30529数据集进行分析,发现TYROBP在这两个数据集中表达显著增加。进一步检测了HG环境下的NRK-52E

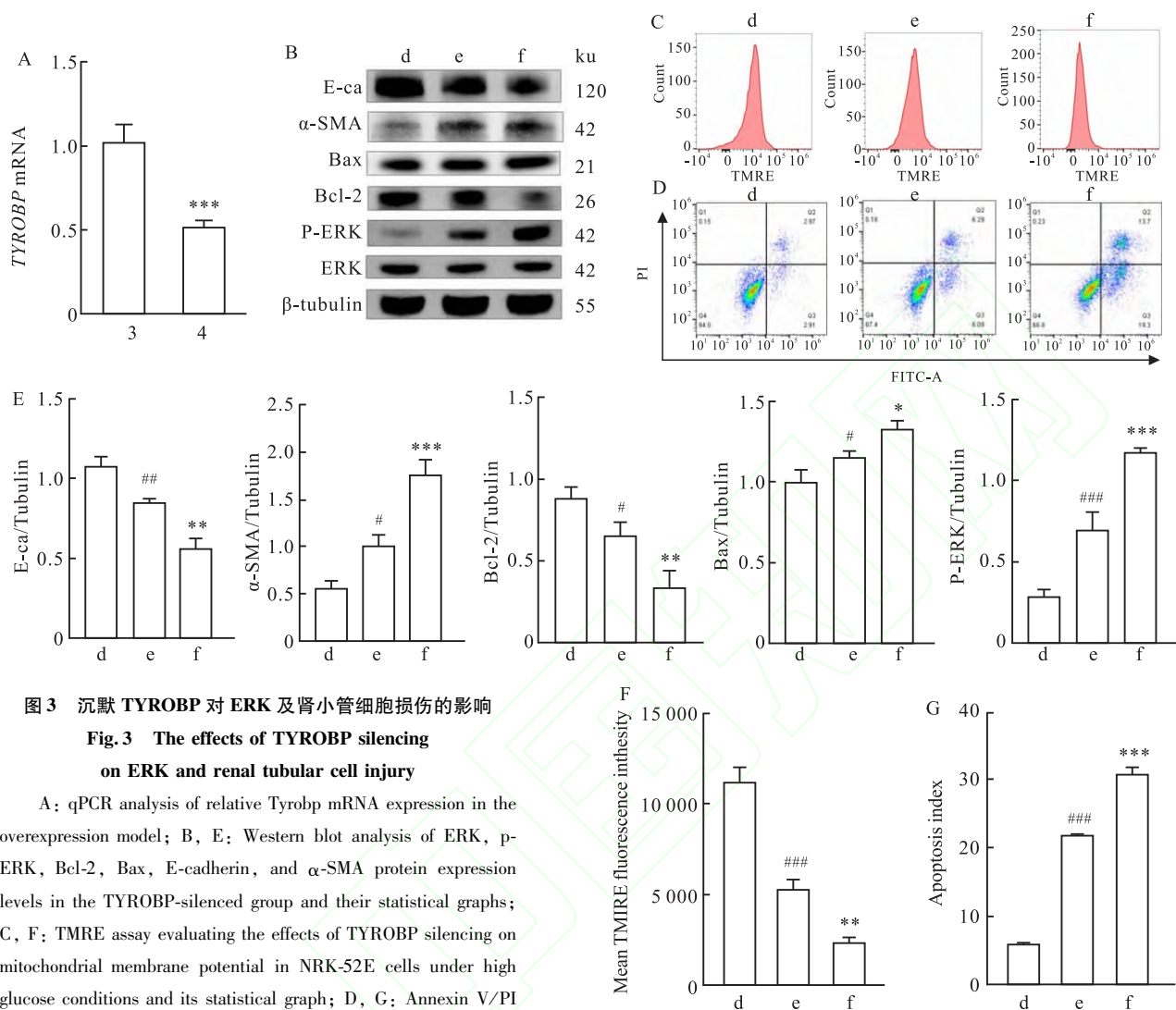


图3 沉默 TYROBP 对 ERK 及肾小管细胞损伤的影响

Fig. 3 The effects of TYROBP silencing on ERK and renal tubular cell injury

A: qPCR analysis of relative Tyrobp mRNA expression in the overexpression model; B, E: Western blot analysis of ERK, p-ERK, Bcl-2, Bax, E-cadherin, and α-SMA protein expression levels in the TYROBP-silenced group and their statistical graphs; C, F: TMRE assay evaluating the effects of TYROBP silencing on mitochondrial membrane potential in NRK-52E cells under high glucose conditions and its statistical graph; D, G: Annexin V/PI assay detecting the effects of TYROBP gene silencing on apoptosis in NRK-52E cells under high glucose conditions and its statistical graph; 3: Scrambled sequence control group; 4: TYROBP-silenced group; d: ss + NG group; e: ss + HG group; f: sh-TYROBP + HG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs ss + NG group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs ss + HG group.

细胞中以及 2 型 DKD 小鼠模型 DB/DB 中 TYROBP 的表达情况,发现无论是在细胞模型还是动物模型中 TYROBP 表达水平均显著增加。提示 TYROBP 及其下游通路的激活在 DKD 发病中是一个普遍现象,可能在 DKD 发病中起到关键作用。

TYROBP 通过影响凋亡以及 EMT 影响 DKD 的进展。TYROBP 含有 5 个外显子,编码 DNAX-activating protein 12 (DAP 12), DAP12 是一种跨膜信号接头蛋白,其参与细胞信号传导,影响细胞的增殖、分化和凋亡^[12]。在一项创伤性脑损伤研究中, TYROBP 基因敲除可以减少活化小胶质细胞分泌的促炎细胞因子,降低神经元细胞凋亡率^[13]。提示 TYROBP 对细胞凋亡途径起着重要调控作用。DKD 发

病过程中存在肾小管细胞凋亡异常^[5]。肾小管上皮细胞具有高能量需求和依赖有氧代谢的特征,其在糖尿病过程中更容易受高血糖、氧化应激、持续性慢性炎症等影响从而导致细胞凋亡的发生,促进 DKD 的进展。EMT 在 DKD 的间质基质沉积和肾纤维化中起重要作用。DKD 中肾小管细胞凋亡的增加常导致 EMT 的增加^[14]。本研究在 HG 环境下的 NRK-52E 细胞中也观测到凋亡增加,凋亡通路以及 EMT 的激活,而过表达 TYROBP 能使 HG 环境下 NRK-52E 线粒体膜电位增加,凋亡和 EMT 水平减少。沉默 TYROBP 基因则使 HG 环境下 NRK-52E 细胞线粒体膜电位降低,凋亡以及 EMT 水平增加。这些结果提示 TYROBP 对 HG 环境下 NRK-52E 细

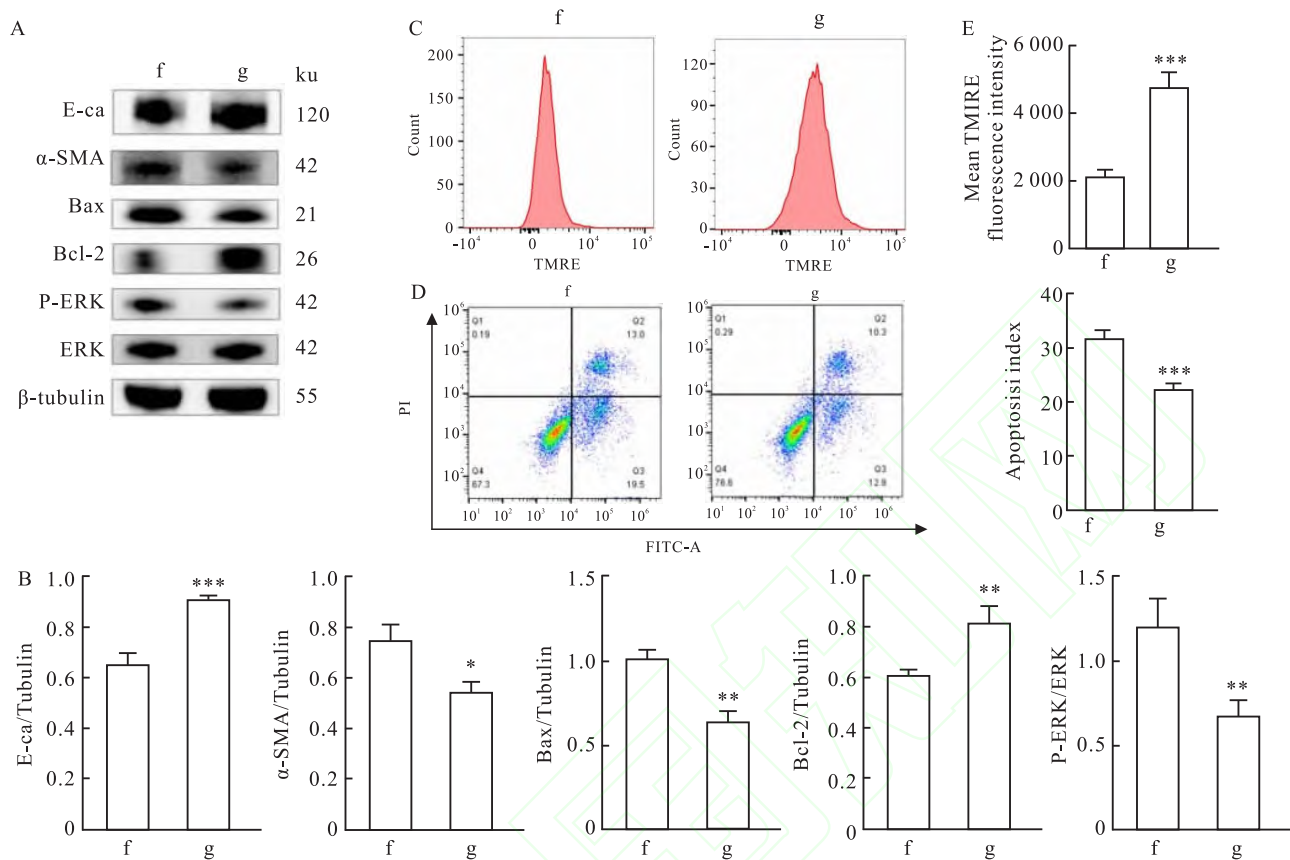


图4 ERK 抑制剂对沉默 TYROBP 诱导的肾小管细胞损伤的影响

Fig.4 The effects of ERK inhibitor on TYROBP silencing-induced renal tubular cell injury

A, B: Western blot analysis of p-ERK/ERK, p-ERK, Bcl-2, Bax, E-cadherin, and α-SMA expression levels and their statistical graphs in the sh-TYROBP + HG glucose group after treatment with an ERK pathway inhibitor; C, E: TMRE detection of mitochondrial membrane potential levels and corresponding statistical analysis in the sh-TYROBP + HG group following ERK pathway inhibitor treatment; D, F: Annexin V/PI detection of apoptosis levels and corresponding statistical analysis in the sh-TYROBP + HG group after ERK pathway inhibitor administration; f: sh-TYROBP + HG group; g: sh-TYROBP + HG + ERK inhibitor group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sh-TYROBP + HG group.

细胞凋亡和 EMT 过程有着重要的调控作用,激活 TYROBP 可以减少肾小管的凋亡,减缓 EMT 进程,并可能减缓 DKD 的进展。提示,在 DKD 患者中 TYROBP 通路的表达增加可能是机体对抗 DKD 损伤的重要保护机制。

TYROBP 可能主要通过 ERK 通路行使其抗凋亡以及 EMT 功能。有文献报道, TYROBP 编码的 DAP12 蛋白可募集激酶 3 (DOK 3) 的下游,并限制 ERK 活化^[15]。另外, TYROBP 敲除的小鼠原代小胶质细胞中 ERK 磷酸化水平增加^[16]。提示 ERK 蛋白是 TYROBP 的下游。ERK 蛋白是 MAPK 家族的重要成员,参与调控细胞生长、分化和凋亡等多种生物学过程, ERK 的适度激活对维持细胞功能至关重要。在 DKD 中, 高血糖等病理因素可能导致 ERK 过度激活, 触发细胞内促凋亡蛋白表达, 导致线粒体功能障碍, 促进肾小管细胞凋亡。文献报道, 在

DKD 中 ERK 通路的过度激活常导致肾小管上皮细胞中 EMT 水平增加^[17]。在一方面, 凋亡细胞释放的炎症因子(如 TNF-α、IL-6)和损伤相关分子模式(DAMPs)可激活 EMT 相关信号通路, 促进肾小管上皮细胞向间充质细胞转化, 另一方面, EMT 过程中, 细胞失去上皮特性并经历代谢和氧化应激的改变, 可能导致细胞凋亡。该研究结果显示, 在 HG 环境下, NRK-52E 细胞过表达 TYROBP 可以抑制 ERK 通路, 并减缓 HG 所导致的细胞凋亡以及 EMT。而沉默 TYROBP 可以激活 ERK 通路, 增加 HG 环境造成的细胞凋亡以及 EMT 水平。提示 TYROBP 可能通过调控 ERK 通路对凋亡和 EMT 途径进行调控。在使用 ERK 抑制剂抑制 ERK 通路的时候, TYROBP 沉默所介导的凋亡通路的激活和 EMT 水平的增加显著减少。提示 ERK 通路在 TYROBP 抗凋亡和抑制 EMT 功能中有重要作用。

综上所述, TYROBP 通路的激活可能是 DKD 患者减缓 DKD 进展的保护机制。TYROBP 通路能通过凋亡影响 DKD 的进展。TYROBP 可能主要通过抑制 ERK 通路抑制肾小管的凋亡和肾小管 EMT 水平, 缓解 DKD 的进展。

参考文献

- [1] 吴晓俊, 倪飞雪, 徐玉雪. 糖尿病肾病核心基因的筛选与鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 610–8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.04.009.
- [1] Wu X J, Ni F X, Xu Y X. Screening and identification of core genes for diabetic nephropathy[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(4): 610–8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.04.009.
- [2] Li B, Zhao X, Xie W, et al. Integrative analyses of biomarkers and pathways for diabetic nephropathy[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1128136. doi: 10.3389/fgene.2023.1128136.
- [3] Lu J, Peng Y, Huang R, et al. Elevated TYROBP expression predicts poor prognosis and high tumor immune infiltration in patients with low-grade glioma[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 723. doi: 10.1186/s12885–021–08456–6.
- [4] Zeng M, Li Q, Chen J, et al. The Fgl2 interaction with Tyrobp promotes the proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating ERK-dependent autophagy[J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(1): 195–204. doi: 10.7150/ijms.66929.
- [5] Shen S, Ji C, Wei K. Cellular senescence and regulated cell death of tubular epithelial cells in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 924299. doi: 10.3389/fendo.2022.924299.
- [6] Hu Y, Tang W, Liu W, et al. Astragaloside IV alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition *via* CX3CL1-RAF/MEK/ERK signaling pathway in diabetic kidney disease[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 1605–20. doi: 10.2147/dddt.s360346.
- [7] Wei J, Wu H, Zhang H, et al. Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1608–18. doi: 10.3892/ijmm.2018.3378.
- [8] Bai Y, Ma L, Deng D, et al. Title: Bioinformatic identification of genes involved in diabetic nephropathy fibrosis and their clinical

relevance[J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(4): 1567–84. doi: 10.1007/s10528–023–10336–6.

- [9] Mafi A, Yadegar N, Salami M, et al. Circular RNAs; powerful microRNA sponges to overcome diabetic nephropathy[J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 227: 153618. doi: 10.1016/j.prp.2021.153618.
- [10] Bailey C J, Day C, Bellary S. Renal protection with SGLT2 inhibitors; effects in acute and chronic kidney disease[J]. *Curr Diabetes Rep*, 2022, 22(1): 39–52. doi: 10.1007/s11892–021–01442–z.
- [11] Roddick A J, Wonnacott A, Webb D, et al. UK kidney association clinical practice guideline: sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibition in adults with kidney disease 2023 UPDATE[J]. *BMC Nephrol*, 2023, 24(1): 310. doi: 10.1186/s12882–023–03339–3.
- [12] Xing J, Titus A R, Humphrey M B. The TREM2-DAP12 signaling pathway in Nasu-Hakola disease: a molecular genetics perspective[J]. *Res Rep Biochem*, 2015, 5: 89–100. doi: 10.2147/rrbc.s58057.
- [13] Zhou X, Song H, He J, et al. Deciphering microglial activation and neuronal apoptosis post-traumatic brain injury: the role of TYROBP in inflammation regulation networks[J]. *Mol Med Rep*, 2024, 29(6): 104. doi: 10.3892/mmr.2024.13228.
- [14] He L, Li Q, Du C, et al. Glis2 inhibits the epithelial-mesenchymal transition and apoptosis of renal tubule cells by regulating the β -catenin signalling pathway in diabetic kidney disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 607: 73–80. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.111.
- [15] Peng Q, Long C L, Malhotra S, et al. A physical interaction between the adaptor proteins DOK3 and DAP12 is required to inhibit lipopolysaccharide signaling in macrophages[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(289): ra72. doi: 10.1126/scisignal.2003801.
- [16] Quipildor G E F. Lack of TREM2 and TYROBP effects on microglial homeostasis, activation and disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(S13): e080570. doi: 10.1002/alz.080570.
- [17] Zhang L, Shen Z Y, Wang K, et al. C-reactive protein exacerbates epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin and ERK signaling in streptozocin-induced diabetic nephropathy[J]. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6551–63. doi: 10.1096/fj.201801865rr.

TYROBP attenuates the progression of diabetic kidney disease by inhibiting the ERK signaling pathway

Li Liang^{1,2}, Huang Jie³, Wang Xinling^{1,2}, Yan Liping^{1,2}, Yu Huiqing^{1,2}, Li Zhiguo^{1,2}

(¹School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

²Hebei Province Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210;

³Dept of Urology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate whether TYRO protein tyrosine kinase-binding protein (TYROBP) affects the

progression of diabetic kidney disease (DKD) through the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway.

Methods Key genes in DKD were identified through bioinformatics analysis. Immunohistochemical staining and quantitative real-time PCR (qPCR) were used to validate the expression levels of TYROBP in a DKD mouse model and high glucose-stimulated NRK-52E cells. NRK-52E cell models with stable TYROBP overexpression/knockdown and their corresponding empty vector (ev)/scrambled sequence (ss) controls were established *via* lentiviral transfection. Cells were treated with 5.5 mmol/L or 30.0 mmol/L glucose for 72 hours to mimic normal glucose (NG) and high glucose (HG) conditions, respectively. High glucose medium containing 3.5 μ mol/L FR180204 was used for ERK inhibitor intervention. The experiment included seven groups: ev + NG, ev + HG, oe-TYROBP + HG, ss + NG, ss + HG, sh-TYROBP + HG, and sh-TYROBP + HG + ERK inhibitor. Western blot was used to detect the expression levels of phosphorylated ERK/total ERK (p-ERK/ERK), apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax), and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA). Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) staining and Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) flow cytometry were performed to assess mitochondrial membrane potential and apoptosis levels. **Results** Bioinformatics analysis identified *TYROBP* as a key gene in DKD. *In vivo* and *in vitro* validation showed increased *TYROBP* mRNA levels in DKD models. The results from the HG model indicated that, compared to the ev + NG/ss + NG group, the ev + HG/ss + HG group demonstrated increased p-ERK/ERK expression, reduced mitochondrial membrane potential, elevated apoptosis, and enhanced EMT. In TYROBP-perturbed NRK-52E cells, compared to the ev + HG group, the oe-TYROBP + HG group showed decreased p-ERK/ERK expression ($P < 0.01$), increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), reduced apoptosis ($P < 0.001$), and attenuated EMT; whereas compared to the ss + HG group, the sh-TYROBP + HG group exhibited increased p-ERK/ERK expression ($P < 0.001$), decreased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), elevated apoptosis ($P < 0.001$), and enhanced EMT. Furthermore, compared to the sh-TYROBP + HG group, the sh-TYROBP + HG + ERK inhibitor group displayed reduced p-ERK/ERK expression ($P < 0.01$), increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.001$), decreased apoptosis ($P < 0.001$), and suppressed EMT. Compared with the scrambled sequence control + high glucose group, the TYROBP knockdown + high glucose group showed elevated p-ERK/ERK expression ($P < 0.001$), reduced mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), increased apoptosis level ($P < 0.001$), and enhanced EMT. Compared with the TYROBP knockdown + high glucose group, the TYROBP knockdown + high glucose + ERK inhibitor group demonstrated decreased p-ERK/ERK expression ($P < 0.01$), restored mitochondrial membrane potential ($P < 0.001$), reduced apoptosis level ($P < 0.001$), and suppressed EMT. **Conclusion** TYROBP may regulate the ERK signaling pathway to modulate apoptosis- and EMT-related proteins, thereby influencing mitochondrial membrane potential, apoptosis, and EMT in renal tubular epithelial cells and contributing to DKD progression.

Key words diabetic nephropathy; renal tubular cell; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition; TYROBP; ERK

Fund programs Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2020209243); Central Government Guiding Local Scientific and Technological Development Fund (No. 236Z7712G)

Corresponding author Li Zhiguo, E-mail: lzg1017@163.com