

DNASE1L3通过抑制PI3K-AKT信号通路延缓肾纤维化进程的机制研究



魏 晓¹, 于 鸿¹, 袁 远¹, 匡崎辉¹, 王 雄², 杨 军¹, 罗鹏程¹

1. 武汉市第三医院泌尿外科 (武汉 430060)

2. 武汉市第三医院药学部 (武汉 430060)

【摘要】目的 探讨 DNASE1L3 在肾纤维化中的作用及机制研究。**方法** 结扎小鼠单侧输尿管构建体内肾纤维化模型, 采用 RT-qPCR 和 WB 检测肾脏中 DNASE1L3 的 mRNA 和蛋白表达水平; 使用 TGF- β 诱导 HK-2 细胞构建体外纤维化模型, 采用 WB 检测 DNASE1L3 的蛋白表达水平; 使用 GEO 数据库联合 GO 富集和 KEGG 通路富集分析 DNASE1L3 可能相互作用的基因及功能; 体外实验在 HK-2 细胞纤维化模型中采用瞬时转染敲低或过表达 DNASE1L3 进行肾纤维化的功能和机制研究。**结果** DNASE1L3 基因在肾纤维化的体内外模型中均表达上调; 体外细胞实验中敲低 DNASE1L3 促进细胞上皮间充质转化, 过表达 DNASE1L3 可有效抑制上皮间充质转化; 生信分析结果显示 DNASE1L3 mRNA 与多种免疫相关生物学过程和炎症信号通路相关; 进一步机制研究发现 DNASE1L3 通过抑制 PI3K-AKT 通路相关信号分子的磷酸化来抑制肾纤维化的进展。**结论** DNASE1L3 通过抑制 PI3K-AKT 信号通路抑制肾纤维化的进程, 为肾纤维化的机制研究提供理论依据。

【关键词】 慢性肾脏病; 肾纤维化; DNASE1L3; PI3K-AKT

【中图分类号】 R 692.5 **【文献标识码】** A

Mechanism of DNASE1L3 delaying renal fibrosis by inhibiting PI3K-AKT signaling pathway

WEI Xiao¹, YU Hong¹, YUAN Yuan¹, KUANG Qihui¹, WANG Xiong², YANG Jun¹, LUO Pengcheng¹

1. Department of Urology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

2. Department of Pharmacy, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

Corresponding authors: LUO Pengcheng, Email: pluo@whu.edu.cn; YANG Jun, Email: yangjun4202@gmail.com

【Abstract】Objective To investigate the role and mechanism of deoxyribonuclease 1L3 (DNASE1L3) in renal fibrosis. **Methods** The renal fibrosis model *in vivo* was established by unilateral ureteral obstruction in mice. The mRNA and protein expression levels of DNASE1L3 in the kidney were detected by RT-qPCR and WB. TGF- β was used to induce HK-2 cells to construct *in vitro* fibrosis model, and WB was used to detect the protein expression level of DNASE1L3. GEO database combined with GO and KEGG pathway enrichment were used to analyze the possible interaction genes and functional analysis of DNASE1L3. The function and mechanism of renal fibrosis were studied *in vitro* by transient transfection of DNASE1L3 knockdown or overexpression

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202501026

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81770688); 武汉市应用基础与前沿项目 (2020020601012209)

通信作者: 罗鹏程, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, Email: pluo@whu.edu.cn

杨军, 博士, 主任医师, 副教授, Email: yangjun4202@gmail.com

in HK-2 cell fibrosis model. **Results** The expression of *DNASE1L3* gene was up-regulated in both *in vitro* and *in vivo* models of renal fibrosis. *In vitro* cell experiments, knockdown of *DNASE1L3* promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT), and overexpression of *DNASE1L3* can effectively inhibit EMT. The results of bioinformatics analysis showed that *DNASE1L3* mRNA was related to a variety of immune-related biological processes and inflammatory signaling pathways. Further mechanism studies have found that DNASE1L3 inhibits the progression of renal fibrosis by inhibiting the phosphorylation of signal molecules related to PI3K-AKT pathway. **Conclusion** DNASE1L3 inhibits the process of renal fibrosis by inhibiting PI3K-AKT signaling pathway, which provides a theoretical basis for the study of the mechanism of renal fibrosis.

【Keywords】 Chronic kidney disease; Renal fibrosis; DNASE1L3; PI3K-AKT

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 在全球的发病率为 10%~14%，我国成年人群中 有 1/10 罹患 CKD，CKD 已经成为危害人类健康的重大公共卫生问题^[1-2]。CKD 的临床特征主要表现为早期诊断率低、晚期不可逆性的肾功能下降^[3]。在 CKD 疾病进展过程中，肾脏结构发生变化并由于纤维蛋白沉积等原因出现纤维化，最终进展为终末期肾脏病^[4-5]。虽然近年来人们对肾纤维化的发病机制及治疗策略的研究取得了一些进展，但对其早期监控和有效治疗靶点的研究并未取得实质性的突破^[6]。因此，探索肾纤维化潜在的发病机制，揭示肾纤维化的病理变化机制，寻找有效的治疗靶点刻不容缓。

脱氧核糖核酸酶 1 (deoxyribonuclease 1, DNase1) 家族蛋白是一类具有脱氧核糖核酸内切酶活性的蛋白，该家族蛋白主要介导调控多种免疫相关疾病^[7]。人体中存在 4 个 DNase1 家族基因，即 *DNASE1*、*DNASE1L1*、*DNASE1L2* 及 *DNASE1L3*，其中 DNASE1L3 蛋白的编码基因位于 3 号染色体短臂。DNASE1L3 能够在细胞外切割单链或双链 DNA，以维持血浆 DNA 的稳态。而在细胞内，DNASE1L3 可以由内质网易位至细胞核参与核小体 DNA 的片段化^[8-9]。DNASE1L3 作为一种重要的生物学分子，已被证明具有抗炎、抑制肿瘤、抗 DNA 自身免疫等广泛的生物学功能。例如，DNASE1L3 可以水解中性粒细胞外陷阱或凋亡小体中的 DNA 来抑制过度炎症或抑制免疫系统过度激活^[10-12]。大量证据表明过度炎症在肾纤维化的发生发展过程中起着核心作用^[13]。然而，能否通过 DNASE1L3 来调控肾纤维化的进展，亟需进一步研究。

本研究通过构建单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 诱导的小鼠肾纤维化

模型和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的人肾近曲小管上皮细胞株 (human kidney-2, HK-2) 细胞纤维化模型，对 DNASE1L3 在肾纤维化中发挥的作用及其具体作用机制进行了探索，以期对肾纤维化的机制研究和靶向治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和饲养

从三峡大学购入 8 周龄的野生型 C57BL/6J 雄性小鼠，体重 20~24 g。小鼠生活在无特定病原体的标准环境中，温度 22~24 °C，湿度 40%~70%，12 h 光暗循环，正常进食。本研究已通过武汉市第三医院动物伦理委员会审批 (批号：武三医实伦 SY2024-012)。

1.1.2 细胞

HK-2 购自中国科学院细胞库 (No. SCSP-511, 上海)，使用前对支原体和衣原体进行了检测，结果呈阴性。

1.1.3 主要试剂

E-cadherin (E-ca) (#GB11868) 一抗购自赛维尔生物科技有限公司， α -SMA (#14395-1-AP)、DNASE1L3 (#67041-1-Ig)、 β -actin (#66009-1-Ig)、p-AKT (#28731-1-AP) 及 AKT (#10176-2-AP) 一抗购自三鹰生物技术有限公司，纤连蛋白 (FN) (#AB2413) 一抗购自英国 Abcam 公司，p-PI3K (#AF3241)、PI3K (#AF6241) 一抗购自 Affinity 公司，山羊抗兔 IgG (#GB25303)、山羊抗鼠 IgG (#GB25301) 购自赛维尔生物科技有限公司，DMEM/F12 (#G4612) 培养基购自赛维尔生物科技有限公司，TGF- β (#100-21) 购自美国 PeproTech 公司，

LipofectamineTM 2000 转染试剂 (#11668019) 购自 Invitrogen 公司, PI3K 抑制剂 LY294002 (#L9908) 购自 Merck 公司, siRNA 及过表达质粒由通用生物公司设计并提供。

1.2 方法

1.2.1 小鼠UUO模型的构建

使用小鼠 UUO 模型模拟梗阻性肾纤维化的过程。雄性 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠, 体重 20~24 g, 适应性饲养一周后, 将野生型小鼠随机分为假手术 (Sham) 组和 UUO 组, 所有小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉, UUO 组小鼠剖腹后经腹部右侧切口用 5-0 丝线在肾盂下 0.5~1 cm 处双重打结结扎右侧输尿管, 假手术组进行右侧输尿管暴露后缝合, 不进行损伤性操作。在手术后 7 d, 使用过量 CO₂ 法处死小鼠 (每组 8 只), 取小鼠肾脏和血清储存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 细胞培养、模型构建和细胞转染

HK-2 细胞在 5% CO₂、恒温 37 °C 环境中培养, 完全培养基成分为 DMEM/F12 培养基混合 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素。细胞富集至培养瓶底 80%~90% 后, 使用 PBS 清洗 2 次后胰酶消化分装传代继续培养。

为模拟肾纤维化的体外模型, 使用 TGF- β 诱导 HK-2 细胞进行造模。6 孔板中的细胞用单纯 DMEM/F12 培养基饥饿孵育过夜后, 用不同浓度的 TGF- β (0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 及 20 ng/mL) 处理, 继续在完全培养基中培养 24 h, 然后收集细胞提取 RNA 或蛋白进一步分析。

将 1×10^6 个细胞均匀接种至 6 孔板进行质粒或 siRNA 转染。6 孔板中细胞富集至 30%~50% 后, 利用 LipofectamineTM 2000 与 siRNA 或质粒进行转染 4~6 h。细胞转染后换液, 在完全培养基中继续培育 48~96 h 后提取蛋白, 通过 Western blot (WB) 评估细胞转染效率。

1.2.3 生物信息学分析

本研究中临床样本肾脏 DNASE1L3 蛋白表达水平从人类蛋白图谱 (The Human Protein Atlas, HPA, <https://www.proteinatlas.org>) 数据库提取。

本研究中公共数据库数据来源于 GEO DataSets 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。R 4.4.1 软件用于数据分析及可视化, dplyr 包用于数据清洗及预处理, limma 包用于差异基因及相关性分析, Pearson 分析用于 DNASE1L3 相关基因分析

($r > 0.5$, $P < 0.05$), clusterProfiler 包用于 GO 及 KEGG 通路富集分析, ggplot2 包用于对富集分析结果进行可视化。

1.2.4 WB实验

提取细胞或组织总蛋白后, 所有蛋白样本通过 BCA 试剂盒 (赛维尔生物科技有限公司) 检测蛋白浓度并进行归一化处理, 蛋白样品在 6%~12% SDS-PAGE 凝胶中分离, 随后转移至 PVDF 膜。5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭。用不同一抗在 4 °C 孵育 12 h 后 $1 \times$ TBST 洗涤 3 次, 用二抗孵育 1 h, 在 $1 \times$ TBST 洗膜后, 使用 Bio-Rad 双色红外激光成像系统对 PVDF 膜显影。Image Lab 和 ImageJ 1.53k 软件用于对采集的图像进行后续分析。

1.2.5 qPCR实验

使用 EastepTM Super 总 RNA 提取试剂盒 (Promega 公司) 从小鼠肾组织或细胞中提取总 RNA, 并用逆转录反应试剂盒 (TOYOBO) 进行逆转录。使用 SYBR Green qPCR master mix 在 95 °C 环境进行 15 min 的初始变性, 然后在 94 °C 10 s, 60 °C 30 s 和 72 °C 1 min 的程序中循环 35 个周期。以 GAPDH 为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法测定 mRNA 水平的相对变化。引物序列如下: 鼠源 DNASE1L3 上游引物序列为 5'-CGGACCCCAAGTTTGTGG-3', 下游引物序列为 5'-GTCCACAAAGCACAATCCTGT-3'; 人源 FN 上游引物序列为 5'-TCAGCTTCCTGGC ACTTCTG-3', 下游引物序列为 5'-TCTTGTCTCT ACATTTCGGCGG-3'; 人源 COL-1 上游引物序列为 5'-AGTGTTTGGATGGTGCCAA-3', 下游引物序列为 5'-GCACCATCATTTCCACGAGC-3'。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 分析实验数据, 并以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间数据比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UUO小鼠模型肾脏组织中DNASE1L3的表达上调

为研究肾纤维化进程中 DNASE1L3 表达水平的变化, 本研究通过结扎小鼠单侧输尿管构建了小鼠 UUO 肾纤维化模型。WB 结果显示, 与假手

术 (Sham) 组相比, UUO 组小鼠模型肾脏中的纤维化标志物 α -SMA、FN 的蛋白表达显著上调, E-ca 的蛋白表达显著下调 (图 1-A 至图 1-D)。DNASE1L3 蛋白表达水平的检测结果显示, 较 Sham 组, UUO 组小鼠肾脏中 DNASE1L3 的蛋白和 mRNA 水平均明显上调 (图 1-E 至图 1-G)。以上结果表明, DNASE1L3 可能参与肾纤维化的进程。

2.2 DNASE1L3在肾小管上皮细胞中丰富表达

为了进一步明确 DNASE1L3 在肾脏中发挥作用的细胞类型, 本研究从 HPA 数据库提取出 DNASE1L3 在临床样本中的蛋白表达水平进行分析, 相较于其他细胞类型, DNASE1L3 在肾小管上皮细胞中的表达丰度明显更高 (图 2)。以上

结果表明 DNASE1L3 可能在肾小管上皮细胞中, 而非其他类型细胞中发挥主要作用。

2.3 TGF- β 诱导的HK-2细胞纤维化模型中DNASE1L3的表达上调

为了进一步研究体外模型中 DNASE1L3 的表达水平, 本研究以不同浓度的 TGF- β (0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 及 20 ng/mL) 诱导 HK-2 细胞构建体外纤维化模型。WB 和 qPCR 的结果显示, 10 ng/mL 的 TGF- β 诱导 24 h 时, 细胞模型构建较为稳定 (图 3-A 至图 3-F)。随后 WB 结果提示, DNASE1L3 在 TGF- β 诱导的 HK-2 细胞模型中的蛋白表达上调 (图 3-G、图 3-H), 与体内实验结果一致。上述所有结果表明 DNASE1L3 可能参与肾纤维化的发生发展。

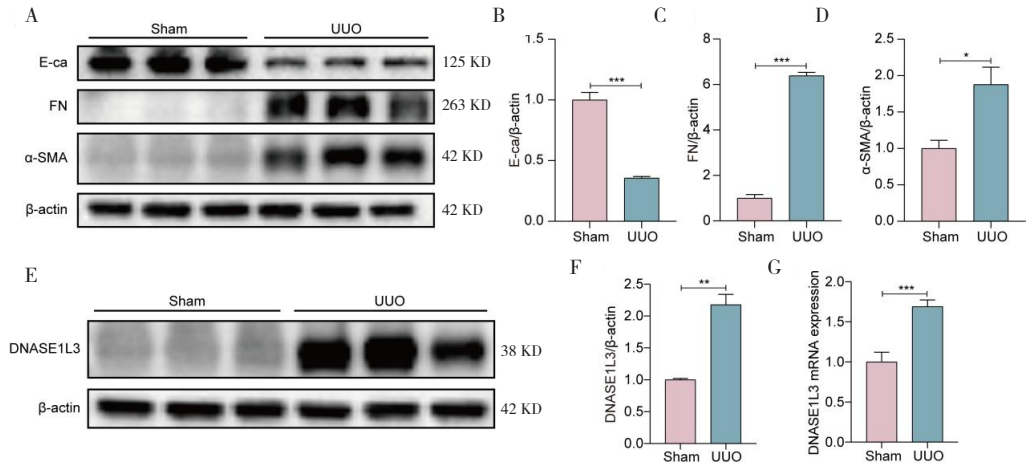


图1 UUO小鼠模型肾脏中DNASE1L3的表达情况

Figure 1. DNASE1L3 expression in kidney of UUO model

注: A-D. Sham组和UUO组小鼠肾脏组织中E-ca、 α -SMA和FN蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); E-F. Sham组和UUO组小鼠肾脏组织中DNASE1L3蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); G. Sham组和UUO组小鼠肾脏组织中DNASE1L3 mRNA的表达情况 ($n=6$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

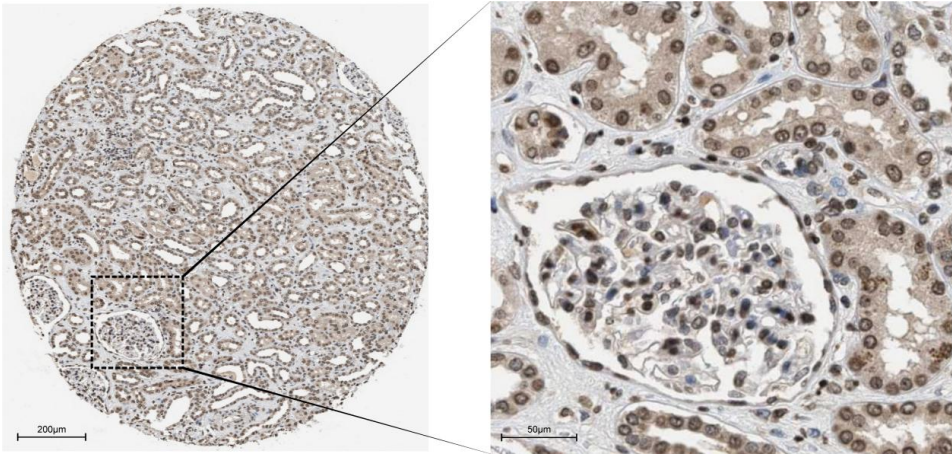


图2 DNASE1L3在肾脏细胞中的表达丰度

Figure 2. Expression abundance of DNASE1L3 in renal cells

注: 临床样本中DNASE1L3的蛋白表达水平从HPA数据库中提取; 左图标尺. 200 μ m; 右图标尺. 50 μ m。

2.4 敲低DNASE1L3促进肾小管细胞的上皮间充质转化

为探索 DNASE1L3 在肾纤维化中扮演的角色,本研究在体外模型中构建了瞬时转染敲低 DNASE1L3 的 HK-2 细胞系,敲低效率通过 WB 实验得到验证(图 4-A、图 4-B)。进一步的 WB 结果显示,在 TGF- β 诱导的细胞模型组中,敲低 DNASE1L3 促进了促上皮-间充质转化(EMT)相关基因(FN、 α -SMA)的蛋白表达,而抗 EMT 相关基因(E-ca)的表达则明显降低,上述结果

证实了体外敲低 DNASE1L3 可以加重 HK-2 细胞的 EMT(图 4-C 至图 4-F)。

2.5 过表达DNASE1L3抑制肾小管细胞的 EMT

为双重验证 DNASE1L3 在肾纤维化中的生物学功能,本研究成功构建了瞬时转染过表达 DNASE1L3 的 HK-2 细胞系,并通过 WB 得到验证(图 5-A、图 5-B)。随后,检测了细胞中 E-ca、 α -SMA 和 FN 的蛋白表达水平,结果显示,在 TGF- β 诱导的细胞模型组中,OE-DNASE1L3 组

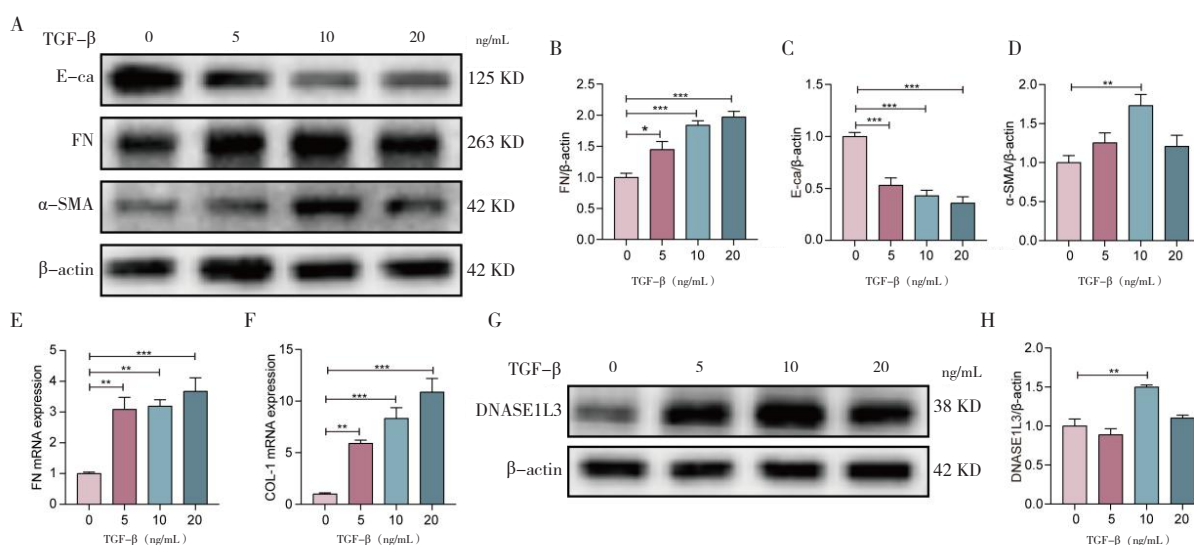


图3 HK-2细胞纤维化模型中DNASE1L3的表达情况

Figure 3. Expression of DNASE1L3 in HK-2 cell fibrosis model

注: A-D. 不同浓度TGF- β (0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL及20 ng/mL) 诱导下HK-2细胞中E-ca、 α -SMA和FN蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); E-F. 不同浓度TGF- β 诱导下HK-2细胞中FN和COL-1 mRNA的表达情况 ($n=3$); G-H. 不同浓度TGF- β 诱导下HK-2细胞中DNASE1L3蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

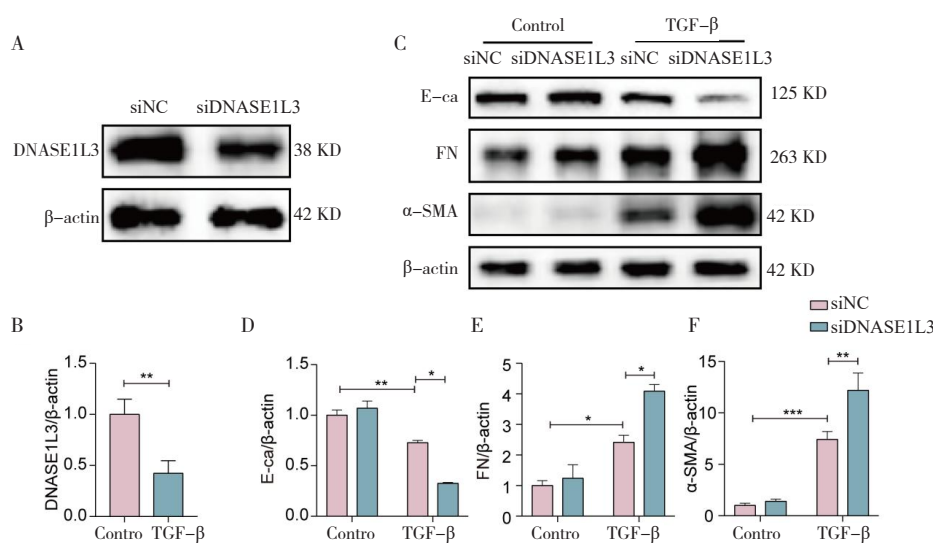


图4 体外敲低DNASE1L3对HK-2细胞EMT相关蛋白的影响

Figure 4. Effects of DNASE1L3 knockdown on EMT-related proteins in HK-2 cell in vitro

注: A-B. HK-2细胞中DNASE1L3敲低效率的蛋白鉴定结果及蛋白印迹定量分析 ($n=3$); C-F. 敲低DNASE1L3后HK-2细胞中E-ca、 α -SMA和FN蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

较 Vector 组促 EMT 相关基因 (FN、 α -SMA) 的表达水平显著下调, 而抗 EMT 相关基因 (E-ca) 的表达则显著上调 (图 5-C 至图 5-F)。以上结果提示过表达 *DNASE1L3* 在肾纤维化体外模型发挥重要保护作用。

2.6 *DNASE1L3* 相关基因的 GO 和 KEGG 分析

为深入探究 *DNASE1L3* 调控肾纤维化的具体机制, 本研究在 GEO 公共数据库下载了数据集 GSE217650 进行生物信息学分析。首先清除低表达量数据, 以 $R > 0.6$ 、 $P < 0.05$ 为标准筛选出与 *DNASE1L3* 基因表达变化相关的基因, 随后对

该基因集进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 (图 6-A、图 6-B)。GO 功能富集结果显示, 这些基因主要参与细胞间黏附的调节 (GO: 0022407, regulation of cell-cell adhesion)、细胞前缘 (GO: 0031252, cell leading edge)、转录共调节因子活性 (GO: 0003712, transcription coregulator activity) 等生物学过程。KEGG 通路富集分析结果表明, 上述基因主要富集在 PI3K-AKT 通路 (mmu04151, PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 通路 (mmu04010, MAPK signaling pathway)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (mmu04060, Cytokine-cytokine receptor interaction)。

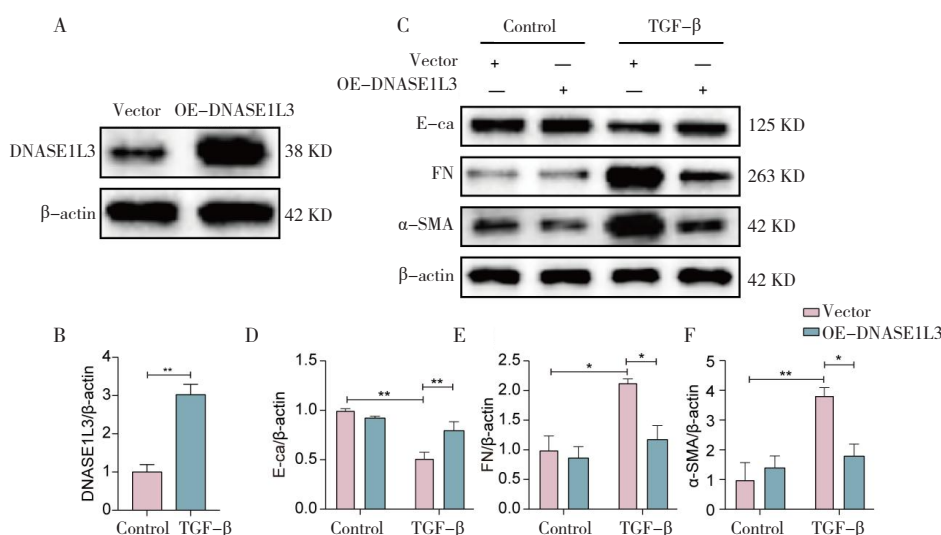


图5 体外过表达*DNASE1L3*对HK-2细胞EMT相关蛋白的影响

Figure 5. Effect of *DNASE1L3* overexpression on EMT-related proteins in HK-2 cell *in vitro*

注: A-B. HK-2细胞中*DNASE1L3*过表达效率的蛋白鉴定结果及蛋白印迹定量分析 ($n=3$); C-F. 过表达*DNASE1L3*后HK-2细胞中E-ca、 α -SMA和FN蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析 ($n=3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

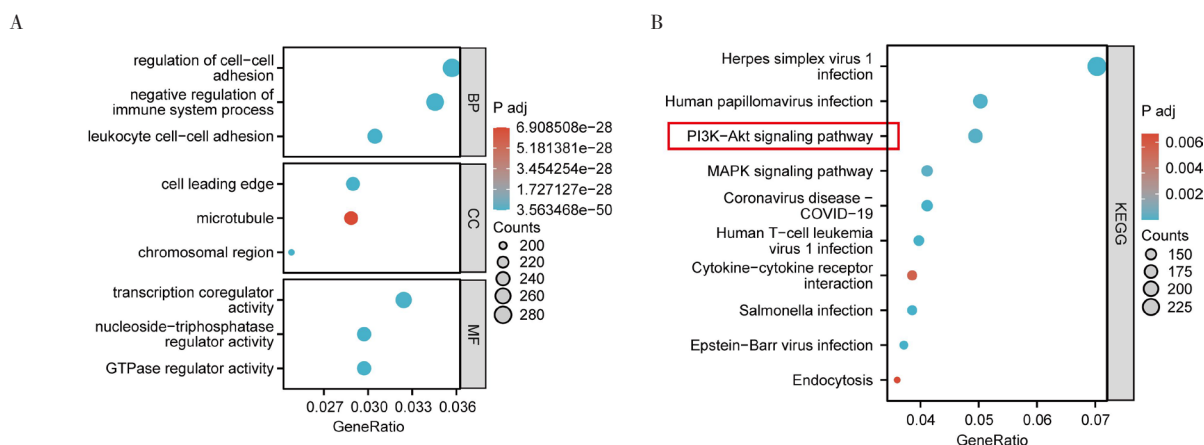


图6 *DNASE1L3* mRNA表达相关基因的GO分析和KEGG通路富集分析

Figure 6. GO analysis and KEGG pathway analysis of related genes of *DNASE1L3* mRNA expression

注: A. GO富集分析; B. KEGG通路富集分析。

2.7 DNASE1L3靶向PI3K-AKT信号通路

结合生物信息学分析,为验证 DNASE1L3 是否通过 PI3K-AKT 信号通路调控肾纤维化的进程,本研究在体外纤维化模型中检测了 DNASE1L3 对 PI3K-AKT 通路相关信号分子 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平的影响。实验结果发现,在 TGF- β 诱导的体外细胞模型组中,与对照组对比,敲低 DNASE1L3 后,p-PI3K 和 p-AKT 的表达均显著升高(图 7-A 至图 7-C);而过表达 DNASE1L3 后,p-PI3K 和 p-AKT 的表达明显降低(图 7-D 至图 7-F)。上述实验结果初步验证了 DNASE1L3 通过影响 PI3K-AKT 信号通路的激活进而影响肾纤维化的进程。

2.8 DNASE1L3依赖PI3K-AKT信号通路调控肾纤维化

为了进一步阐明 DNASE1L3 在调节肾纤维化过程中是否依赖于 PI3K/AKT 信号通路来发挥作用,使用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 进行体外回复实验。WB 结果显示在 TGF- β 诱导的 HK-2 细胞纤维化模型中,敲低 DNASE1L3 后 EMT 相关基因 FN 和 α -SMA 的表达显著升高,E-ca 的表达显著下降;随后,在敲低 DNASE1L3 的同时加入 LY294002 后 EMT 表型回复(图 8-A 至图 8-C)。以上结果证明, DNASE1L3 依赖 PI3K/AKT 信号通路来调节肾纤维化。

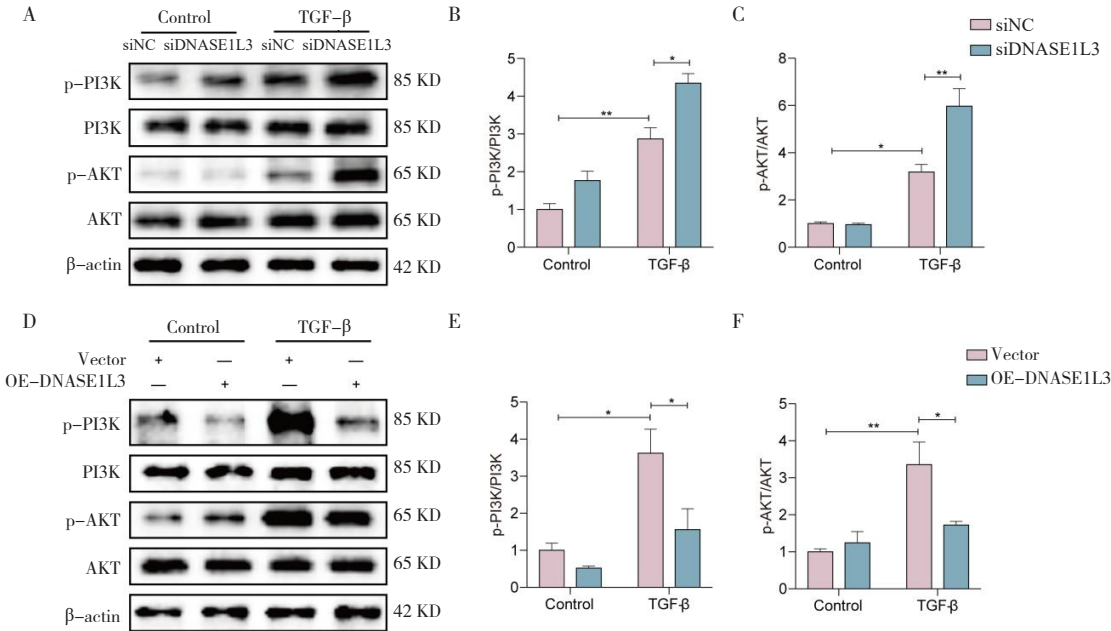


图7 体外调控DNASE1L3对PI3K-AKT信号通路相关蛋白的影响

Figure 7. Effect of regulating DNASE1L3 on PI3K-AKT signaling pathway-related proteins in vitro

注: A-C. 敲低DNASE1L3后HK-2细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析($n=3$); D-F. 过表达DNASE1L3后HK-2细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析($n=3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

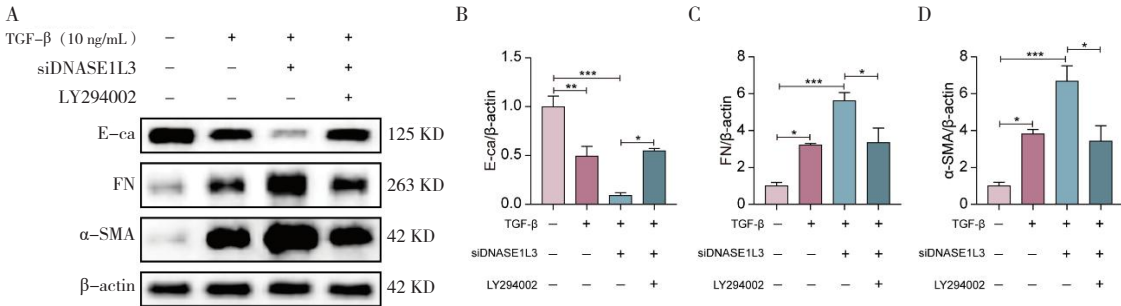


图8 体外敲低DNASE1L3且抑制PI3K对HK-2细胞EMT相关蛋白的影响

Figure 8. Effects of knocking down DNASE1L3 and inhibiting PI3K on EMT-related proteins in HK-2 cell in vitro

注: A-D. 敲低DNASE1L3并抑制PI3K-AKT信号通路后HK-2细胞中E-ca、 α -SMA和FN蛋白的表达情况和蛋白印迹定量分析($n=3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

肾纤维化是梗阻性肾病、狼疮性肾病等多种慢性肾脏疾病发展为终末期肾脏病过程中不可避免的病理改变^[4, 13-14]。肾纤维化的动态进展过程中促纤维化微环境形成、炎症过度激活、肾小管上皮细胞损伤、肌成纤维细胞激活、细胞外基质沉积,最终致使肾脏结构和功能发生不可逆性损害^[15-16]。虽然目前针对肾纤维化患者已有一些药物可以起到部分疗效,但患者肾功能进行性下降和晚期生活质量堪忧等问题仍然严峻^[2, 17]。因此,揭示肾纤维化的发病机制、寻找新的靶向治疗策略迫在眉睫。

本研究从动物和细胞层面揭示了 DNASE1L3 在肾纤维化进展过程中的重要作用以及机制。主要结果总结如下:① DNASE1L3 在 UUO 诱导的肾纤维化模型及 TGF- β 诱导的 HK-2 细胞纤维化模型中的表达水平显著升高;②在体外 TGF- β 诱导的 HK-2 细胞纤维化模型中,与对照组相比,敲低 DNASE1L3 后促进 EMT,而过表达 DNASE1L3 可抑制 EMT;③ DNASE1L3 通过 PI3K-AKT 信号通路调控肾纤维化的进展。

DNASE1L3 是脱氧核糖核酸酶 1 家族的成员之一,主要通过巨噬细胞、树突状细胞分泌,是一种免疫相关蛋白。既往研究表明, DNASE1L3 在清除游离 DNA 片段、抑制肿瘤增殖转移等生物功能中发挥重要作用^[18-19]。但是, DNASE1L3 在肾间质纤维化中的作用暂未见报道,有待进一步研究。本研究结果显示在体内外纤维化模型中, DNASE1L3 表达水平明显上调,这表明在纤维化过程中 DNASE1L3 被诱导表达, DNASE1L3 可能参与了肾纤维化的发生发展过程。

DNASE1L3 在抑制机体自身过度免疫和抗炎方面起着至关重要的作用,在细胞外, DNASE1L3 可以通过降解凋亡微粒发挥作用,而内源性的 DNASE1L3 则可以易位至细胞核并片段化核小体^[20]。近年来, DNASE1L3 在肿瘤方面的作用也引起广泛关注,在肝细胞癌和肺腺癌等多种肿瘤中, DNASE1L3 通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭和血管形成等生物学过程来抑制肿瘤的进展^[19, 22]。但是在肾纤维化中, DNASE1L3 扮演的角色尚不清楚。本研究发现 DNASE1L3 可

抑制肾小管上皮细胞的间质转化过程,这说明 DNASE1L3 在肾纤维化过程中可能起着重要调节作用。

PI3K-AKT 通路是生物过程中一个至关重要的信号传导路径,在多种疾病,尤其是纤维化疾病中扮演着关键角色^[22]。在细胞质中, PI3K 首先被酪氨酸激酶激活,将 PIP2 磷酸化为 PIP3,进而促进 AKT 的募集, AKT 的活化进一步促进各种生物学功能的进行^[22]。本团队既往研究发现在肾纤维化过程中, STAP2 可以靶向 HSP27 的磷酸化,进而激活 PI3K-AKT 信号通路来促进肾纤维化的进展^[23]。本研究通过生物信息学分析初步发现 PI3K-AKT 通路为 DNASE1L3 的效应通路之一并进行回复验证,证实 DNASE1L3 依赖 PI3K-AKT 通路调控肾纤维化这一病理过程。

由于肾纤维化的不可逆性,临床实践更倾向于早期筛查和诊断肾损伤人群并实施针对性的干预措施^[13]。本研究发现, DNASE1L3 在肾纤维化的体内外模型中均出现显著上调,这为肾纤维化的早期诊断提供了一个潜在的靶点。此外,在细胞中过表达 DNASE1L3 能够抑制细胞 EMT,同时也能抑制 PI3K-AKT 信号通路的激活。过表达 DNASE1L3 在抑制细胞 EMT 进展中所起的作用与 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 相似,这为临床治疗提供了延缓肾纤维化进展的潜在治疗靶点。

本研究也存在一些局限性,例如,对于 DNASE1L3 的机制研究仅局限于 HK-2 细胞,而未进行体内实验。此外, DNASE1L3 通过 PI3K-AKT 通路调控肾纤维化的机制仅进行了初步研究, DNASE1L3 调控 PI3K-AKT 通路的具体方式以及该蛋白发挥作用的具体结构域有待进一步研究。

总之,本研究证实 DNASE1L3 通过靶向 PI3K-AKT 通路抑制肾纤维化的进展。 DNASE1L3 有望成为肾纤维化的诊断和治疗的新靶点,为后续肾纤维化机制的研究以及靶向治疗纤维化提供新的思路和策略。

伦理声明: 本研究已获得武汉市第三医院动物伦理委员会审批(批号:武三医实伦SY2024-012)

作者贡献: 研究设计:罗鹏程、杨军;实验操作:魏晓、于鸿;数据采集:魏晓、袁远;数据分析:

魏晓、匡崎辉；论文撰写：魏晓；论文审定：罗鹏程、杨军和王雄

数据获取：本研究中使用和（或）分析的数据可联系通信作者获取

利益冲突声明：无

致谢：不适用

参考文献

- Francis A, Harhay MN, Ong ACM, et al. Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2024, 20(7): 473–485. DOI: [10.1038/s41581-024-00820-6](#).
- Wang L, Xu X, Zhang M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance[J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183(4): 298–310. DOI: [10.1001/jamainternmed.2022.6817](#).
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2024, 105(4S): S117–S314. DOI: [10.1016/j.kint.2023.10.018](#).
- Feng YL, Wang WB, Ning Y, et al. Small molecules against the origin and activation of myofibroblast for renal interstitial fibrosis therapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111386. DOI: [10.1016/j.biopha.2021.111386](#).
- Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis[J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309–326. DOI: [10.1146/annurev-physiol-022516-034227](#).
- Rayego-Mateos S, Valdivielso JM. New therapeutic targets in chronic kidney disease progression and renal fibrosis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(7): 655–670. DOI: [10.1080/14728222.2020.1762173](#).
- Martínez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, et al. DNase 1 and systemic lupus erythematosus[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(5): 359–363. DOI: [10.1016/j.autrev.2008.02.002](#).
- Sisirak V, Sally B, D'Agati V, et al. Digestion of chromatin in apoptotic cell microparticles prevents autoimmunity[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 88–101. DOI: [10.1016/j.cell.2016.05.034](#).
- Stabach PR, Sims D, Gomez-Bañuelos E, et al. A dual-acting DNASE1/DNASE1L3 biologic prevents autoimmunity and death in genetic and induced lupus models[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(14): e177003. DOI: [10.1172/jci.insight.177003](#).
- Hartl J, Serpas L, Wang Y, et al. Autoantibody-mediated impairment of DNASE1L3 activity in sporadic systemic lupus erythematosus[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(5): e20201138. DOI: [10.1084/jem.20201138](#).
- Sun J, Wang X, Shen Q, et al. DNASE1L3 inhibits hepatocellular carcinoma by delaying cell cycle progression through CDK2[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2022, 45(6): 1187–1202. DOI: [10.1007/s13402-022-00709-1](#).
- Magna M, Pisetsky DS. The alarmin properties of DNA and DNA-associated nuclear proteins[J]. *Clin Ther*, 2016, 38(5): 1029–1041. DOI: [10.1016/j.clinthera.2016.02.029](#).
- Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 129. DOI: [10.1038/s41392-023-01379-7](#).
- Nørregaard R, Mutsaers HAM, Frøkiær J, et al. Obstructive nephropathy and molecular pathophysiology of renal interstitial fibrosis[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2827–2872. DOI: [10.1152/physrev.00027.2022](#).
- Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(3): 144–158. DOI: [10.1038/s41581-019-0110-2](#).
- Zhao X, Li Y, Yu J, et al. Role of mitochondria in pathogenesis and therapy of renal fibrosis[J]. *Metabolism*, 2024, 155: 155913. DOI: [10.1016/j.metabol.2024.155913](#).
- 吉晶, 何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 221–228. [Ji J, He LQ. Prevention and treatment of renal fibrosis with integrated traditional Chinese and Western medicine[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 24(19): 221–228.] DOI: [10.13422/j.cnki.syfjx.20181725](#).
- Han DSC, Ni M, Chan RWY, et al. The biology of cell-free DNA fragmentation and the roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB[J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 106(2): 202–214. DOI: [10.1016/j.ajhg.2020.01.008](#).
- Meng F, Yang X, Xiao P. DNASE1L3 regulation by transcription factor FOXP2 affects the proliferation, migration, invasion and tube formation of lung adenocarcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(2): 72. DOI: [10.3892/etm.2022.11771](#).
- Keyel PA. Dnases in health and disease[J]. *Dev Biol*, 2017, 429(1): 1–11. DOI: [10.1016/j.ydbio.2017.06.028](#).
- Guo D, Ma D, Liu P, et al. DNASE1L3 arrests tumor angiogenesis by impairing the senescence-associated secretory phenotype in response to stress[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 9874–9899. DOI: [10.18632/aging.202740](#).
- Zhang Y, Jin D, Kang X, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 696542. DOI: [10.3389/fcell.2021.696542](#).
- Yuan Y, Wei X, Xiong X, et al. STAP2 promotes the progression of renal fibrosis via HSP27[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1018. DOI: [10.1186/s12967-024-05776-6](#).

收稿日期：2025 年 01 月 06 日 修回日期：2025 年 04 月 20 日
本文编辑：桂裕亮 曹 越

引用本文：魏晓, 于鸿, 袁远, 等. DNASE1L3通过抑制PI3K-AKT信号通路延缓肾纤维化进程的机制研究[J]. 医学新知, 2025, 35(5): 527–535. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202501026](#).
Wei X, Yu H, Yuan Y, et al. Mechanism of DNASE1L3 delaying renal fibrosis by inhibiting PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2025, 35(5): 527–535. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202501026](#).