



授予单位代码	10089
学号或申请号	20181006
中国图书分类号	R361
是否保密及密级	否

河北医科大学

Hebei Medical University

博士学位论文

学术学位

DDIT4 在糖尿病肾病肾小管细胞焦亡中的作用
及机制研究

**The Role and Mechanism of DDIT4 in Renal Tubular
Cells Pyroptosis of Diabetes Nephropathy**

研 究 生：周欢娣
导 师：史永红教授

专 业：病理学与病理生理学
二级学院：基础医学院

2024 年 4 月

目 录

英文缩写.....	15
引言.....	17
第一部分 DDIT4 在糖尿病肾病肾小管细胞焦亡和肾纤维化中的作用.....	20
前言.....	20
材料与方法.....	21
结果.....	39
讨论.....	66
小结.....	69
参考文献.....	70
第二部分 DDIT4 通过调控 NLRP3 炎症小体激活对高糖诱导的肾小管细胞焦亡的影响.....	72
前言.....	72
材料与方法.....	73
结果.....	81
讨论.....	104
小结.....	106
参考文献.....	107
第三部分 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 在糖尿病肾病中的作用和相关性.....	110
前言.....	110
材料与方法.....	111
结果.....	112
讨论.....	123
小结.....	125
参考文献.....	126
结论.....	129
综述 糖尿病肾病分子标志物的研究.....	130
参考文献.....	142

DDIT4 在糖尿病肾病肾小管细胞焦亡中的作用及机制研究

摘 要

目的: 糖尿病肾病是终末期肾病的主要原因, 现有治疗效果不佳, 其发病机制仍不明确, 亟需探索糖尿病肾病治疗策略相关的疾病进展的精确分子机制, 寻找潜在的治疗靶点。

DDIT4 作为一种关键的压力调节蛋白, 参与细胞生长、凋亡、代谢和氧化应激, 与多种代谢性疾病相关。然而 DDIT4 与糖尿病肾病的作用仅个别报道, 具体机制尚不明确。

细胞焦亡是一种炎症性程序性细胞死亡, 其特征是细胞肿胀、破裂、细胞内容物释放和显著的促炎作用。焦亡引起的炎症和细胞损伤与糖尿病肾病的进展密切相关, 加重肾纤维化、肾小球硬化和肾小管损伤, 但是糖尿病肾病中, 介导细胞焦亡继而加重肾小管细胞纤维化反应的具体机制尚不明确。焦亡的核心是激活 NLRP3 炎症小体, NLRP3 是 NLRP3 炎症小体的核心分子之一。作为一种炎症和免疫相关疾病, 大量证据支持肾小管间质的炎性成分, 特别是近端肾小管上皮细胞的炎性成分, 在糖尿病肾病的发病机制中起核心作用。CCR2 在单核细胞、髓样前体细胞和 T 细胞、树突状细胞和多种组织实质细胞上表达, 是促炎症反应的化学诱导剂。

本研究以人肾小管上皮 HK-2 细胞、1/2 型糖尿病小鼠模型、临床糖尿病肾病患者活检标本为研究对象, 通过体内、体外实验, 临床标本检测, 探讨 DDIT4 在糖尿病肾病中的作用及调控机制, 为探索糖尿病肾病防治新靶点提供实验依据。

方法:

1. 以 HK-2 细胞为研究对象, 高糖 (30 mmol/L glucose) 诱导 HK-2 细胞不同时间点, 检测 DDIT4 mRNA 和蛋白质的表达变化, 以及 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路的活化情况。根据结果选择高糖刺激最佳时间点, 通过 AO/EB 实验检测细胞膜完整性, LDH 含量检测分析细胞膜受损情况, CCK-8 实验检测细胞活力, EDU 实验检测细胞增殖活性, FLICA/PI 免疫荧光共聚焦实验以及流式细胞术检测细胞焦亡的发生情况。Western Blot 和免疫荧光检测 DDIT4, 细胞焦亡执行蛋白 GSDMD,

中文摘要

NLRP3 炎症小体关键组分以及糖尿病肾脏纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen I 的表达。

2. 以 HK-2 细胞为研究对象, 敲低或过表达 DDIT4, 高糖诱导 48h。实验分组为 NG 组, M 组, HG 组, HG+NC 组 (敲低阴性对照组), HG+shDDIT4 组 (DDIT4 敲低组); 或者为 NG 组, M 组, HG 组, HG+Vector 组 (过表达阴性对照组), HG+DDIT4 组 (DDIT4 过表达组)。通过 AO/EB 双染、LDH 活性检测、CCK-8、EDU 实验、FLICA/PI 免疫荧光共聚焦实验、流式细胞术、Western Blot 以及免疫荧光等实验, 检测高糖环境下, 干预 DDIT4 对 HK-2 细胞焦亡、纤维化反应以及 NLRP3 炎症小体激活的影响。

3. 以 STZ 诱导的糖尿病小鼠为研究对象, 探讨敲除 DDIT4 对焦亡、糖尿病肾损伤以及 NLRP3 炎症小体的调控作用。分为四组, WT 组 (注射枸橼酸盐缓冲液), WT-DKO 组 (注射枸橼酸盐缓冲液), STZ-WT 组 (腹腔注射 50 mg/kg/day STZ, 连续 5 天) 和 STZ-DKO 组 (腹腔注射 50 mg/kg/day STZ, 连续 5 天)。Masson 和 PAS 染色观察小鼠肾脏病理改变; 收集血尿标本, 检测生化指标的变化; Western Blot 和免疫组织化学检测焦亡执行蛋白 GSDMD, 纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen I, 以及 NLRP3 炎症小体关键组分的表达变化。

4. 以 db/db 糖尿病小鼠为研究对象, 探讨敲低 DDIT4 对焦亡、糖尿病肾损伤以及 NLRP3 炎症小体的调控作用。8 周龄 18 只 db/db 小鼠, 6 只 db/m 小鼠同窝对照。行肾盂原位注射术, 转染腺相关病毒 AAV-9, 敲低 DDIT4。分组情况 db/m 组, db/db 组 (不处理), db/db-control 组 (右侧肾盂原位注射 HBAAV2/9-luc NC 对照), shDDIT4 组 (右侧肾盂原位注射 HBAAV2/9-m-DDIT4shRNA-luc, shDDIT4 序列: TTCTCCGAACG TGTCACGTAA)。术后 8 周取材, 检测各组小鼠代谢 (体重、肾重和血糖) 和生化指标 (BUN, Scr, UAE 和 UACR) 的变化。Masson 和 PAS 染色观察小鼠肾脏病理改变; Western Blot 和免疫组织化学检测 DDIT4, 焦亡执行蛋白 GSDMD, 纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen I, 以及 NLRP3 炎症小体关键组分的表达变化。

5. 以 HK-2 细胞为研究对象, 探讨高糖环境下 DDIT4 通过上调 NLRP3 介导细胞焦亡的作用机制。免疫荧光共聚焦检测 DDIT4 和 NLRP3

共定位情况。构建 NLRP3-crispr 质粒,过表达 DDIT4 的同时敲低 NLRP3, AO/EB 双染、LDH 活性检测、CCK-8、EDU 实验、FLICA/PI 免疫荧光共聚焦实验、Western Blot 以及免疫荧光等实验,检测肾小管上皮细胞焦亡,纤维化反应以及 NLRP3 炎症小体的变化。进一步,高糖环境下过表达 DDIT4 的同时加入 NLRP3 选择性抑制剂 MCC950,检测肾小管上皮细胞焦亡,纤维化反应以及 NLRP3 炎症小体的变化。

6. 从 GEO 数据库查询有关糖尿病肾病肾小管表达谱的芯片数据,比较糖尿病肾病患者以及对照组肾脏组织的 DDIT4 表达差异,受试者工作特征曲线分析 DDIT4 鉴别糖尿病肾病的能力。进一步收集 40 例临床糖尿病肾病患者活检标本和 30 例对照组织,免疫组织化学检测连续切片中 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号的表达情况,并进行 ROC 曲线分析以及相关性分析。另外,有完整临床信息的 30 例糖尿病肾病标本中,分析 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 各因子表达水平与临床参数的关系。

7. 以 1/2 型糖尿病小鼠为研究对象,Western Blot 和免疫组织化学检测肾脏组织敲除/敲低 DDIT4 后,CCR2 的表达变化。

结果:

1. 高糖诱导对肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)DDIT4、NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的表达以及细胞焦亡和纤维化反应的作用。

高糖诱导 HK-2 细胞,DDIT4 mRNA 和蛋白质表达呈时间依赖性增强,48h 达到高峰。同样地,NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路呈时间依赖性激活,48h 达到高峰。因此以下实验选择最佳时间点为高糖刺激 48h。NG(正常糖,5.6 mmol/L glucose)、M(高渗对照组,5.6 mmol/L glucose+24.4 mmol/L mannitol)、HG(高糖组,30 mmol/L glucose)不同条件下干预 HK-2 细胞 48h,AO/EB 显示高糖诱导的 HK-2 细胞橘红色荧光染色增强,细胞膜完整性受损;乳酸脱氢酶活性检测结果显示,高糖诱导下的 HK-2 细胞释放的 LDH 明显增多,细胞膜发生破裂;CCK-8 细胞活力检测结果显示,高糖诱导的 HK-2 细胞活力明显降低;EDU 细胞增殖活性检测结果显示高糖诱导下的 HK-2 细胞 EDU 染色比例降低,细胞增殖活性减弱;免疫荧光共聚焦分析 FLICA(活性 Caspase-1)和 PI 双染结果显示,相比 NG 组,HG 组发生焦亡的细胞(FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性染色)增加了 1.07 倍;流式细胞术检测结果显示 HG 组细胞发生

中文摘要

焦亡的比例明显增多；Western blot 结果显示，高糖诱导的 HK-2 细胞中焦亡和纤维化相关蛋白：NLRP3, Pro-caspase-1, Caspase-1 P20, GSDMD-FL(GSDMD 全长), GSDMD-N(GSDMD 活性片段), ASC, IL-1 β (mature), IL-18, FN1, Collagen I 表达显著增加；免疫荧光显示高糖诱导下，HK-2 细胞中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、FN1 和 Collagen I 荧光强度增强。

2. 以 HK-2 细胞为研究对象，敲低或过表达 DDIT4 对细胞焦亡、纤维化反应以及 NLRP3 炎症小体激活的影响。

相比 HG 组，敲低 DDIT4 的 HK-2 细胞中，AO/EB 双染橘红色荧光染色减弱，LDH 释放减少，细胞活力和细胞增殖活性增加，FLICA/PI 免疫荧光双染双阳性细胞比例减少，流式细胞术检测细胞焦亡比例降低，GSDMD（全长和活性片段），纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen I, NLRP3 炎症小体各组蛋白 NLRP3、ASC、Caspase-1 前体（Pro-Caspase-1）、活化的 Caspase-1（Caspase-1-p20）以及细胞因子 IL-1 β （precursor）、IL-1 β （mature）和 IL-18 的表达减弱。相反，与 HG 组相比，过表达 DDIT4 的 HK-2 细胞上述现象加重，且相关蛋白表达增强。

3. 以 STZ 诱导糖尿病小鼠为研究对象，探讨敲除 DDIT4 对焦亡、糖尿病肾损伤以及 NLRP3 炎症小体的调控作用。

相比 WT 组，STZ 诱导的糖尿病小鼠的肾小球体积变大，系膜基质增多，基底膜存在不规则增厚。STZ-DKO 组小鼠的肾小球和肾小管的形态结构明显改善。与 WT 组小鼠相比，糖尿病组小鼠的 BG（血糖）、KW（肾重）、UAE、UACR、BUN 和 Scr 则显著增高，且其 BW（体重）显著降低。与 STZ-WT 组小鼠相比，STZ-DKO 组小鼠的 BG、UAE、UACR、BUN 和 Scr 水平明显下降。对比 WT 组，STZ-WT 组小鼠肾脏组织的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N, FN1 和 Collagen I, 以及 NLRP3 炎症小体各组蛋白 NLRP3, Caspase-1-p20, ASC, IL-1 β （precursor）, IL-1 β (mature) 表达水平均显著增加，而 DDIT4 基因敲除可以导致上述蛋白表达下降。

4. 以 db/db 糖尿病小鼠为研究对象，探讨敲低 DDIT4 对焦亡，糖尿病肾损伤以及 NLRP3 炎症小体激活的调控作用。

相比于 db/m 组，DDIT4 在 db/db 组和 db/db-control 组小鼠肾脏组织的中存在广泛的胞浆染色。与 db/m 小鼠相比，db/db 组和 db/db-control 组的小鼠，肾小球体积明显增大，系膜区扩宽，系膜基质增多。敲低 DDIT4

后上述症状明显改善。各组小鼠各种代谢指标的变化结果显示：与 db/m 组比，db/db 组和 db/db-control 组小鼠的 BW 和 BG 明显增加，且 BG 均高于 16.7 mmol/L，KW 变化不明显。UAE，UACR，BUN 和 Scr 也显著增高。DDIT4 敲低后，db/db 小鼠的上述代谢指标均显著下降。另外，与 db/m 小鼠相比，db/db 组小鼠肾组织的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N，FN1 和 Collagen I，以及 NLRP3 炎症小体各组分 NLRP3，pro-Caspase-1，Caspase-1-p20，ASC，IL-1 β (precursor)，IL-1 β (mature) 表达水平均显著增加，而敲低 DDIT4 的 db/db 小鼠 (db/db-shDDIT4 组) 肾脏组织中，上述蛋白表达下降 (Pro-Caspase-1 和 IL-1 β (precursor) 仅有下降趋势)。

5. 以 HK-2 细胞为研究对象，探讨高糖环境下，DDIT4 通过上调 NLRP3 介导细胞焦亡的作用机制。

免疫荧光共定位结果显示高糖诱导下，DDIT4 与 NLRP3 在 HK-2 细胞中有明显的共定位。高糖环境下，相对于 DDIT4 单独过表达的 HK-2 细胞，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞，细胞膜完整性的受损程度得到缓解，LDH 释放减少，细胞活力以及细胞增殖活性均得到有效恢复，FLICA 和 PI 双阳性细胞减少。GSDMD-FL 和 GSDMD-N、NLRP3、pro-Caspase-1 和 Caspase-1-p20、ASC、IL-1 β (precursor)、IL-1 β (mature)，Collagen I 和 FN1 表达水平均明显下降。相似地，相对于 DDIT4 单独过表达的 HK-2 细胞，过表达 DDIT4 的同时加入 NLRP3 抑制剂 MCC950 的 HK-2 细胞，展示出类似的变化趋势。

6. DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 在糖尿病肾病 GEO 数据集以及临床病理切片中的表达和相关性分析

从 GEO 数据库中下载 3 个糖尿病肾病患者肾小管的基因芯片数据集 GSE47184、GSE104954 和 GSE99325。三个数据集中，DN 组 DDIT4 的表达明显高于 Control 组，且 ROC 分析结果显示三个数据集 DDIT4 的 AUC 分别为 0.917，0.894 和 0.843。40 例糖尿病肾病患者活检组织以及 30 例对照组织中，免疫组织化学检测显示 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 的表达，在糖尿病肾病患者的肾脏组织中明显增强，ROC 曲线分析显示 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 对于糖尿病肾病具有较高的诊断能力。另外，在 DN 组织中，四因子之间存在高度正相关。有完整临床信息的 30 例糖尿病肾病患者临床参数分析显示，DDIT4/NLRP3/GSDMD/

中文摘要

CCR2 表达水平与糖尿病肾病患者的性别, 级别, 病程, BMI, FBG, SBP, DBP, HbA_{1c} (%), UA, TC, TG, LDL 均不相关。DDIT4 与 Urea nitrogen, Scr 显著正相关, 与 Hb, eGFR 负相关; NLRP3 与年龄, Scr, 24h 蛋白尿显著正相关, 与 Hb, eGFR 负相关; GSDMD 与 Urea nitrogen, Scr, 24h 蛋白尿显著正相关, 与 eGFR 负相关; CCR2 与年龄和 Scr 之间显著正相关, 与 Hb, Alb, eGFR 之间存在显著负相关。

7. 以 1/2 型糖尿病小鼠为研究对象, 敲除/敲低 DDIT4 对小鼠肾脏组织 CCR2 的影响。

STZ 诱导的糖尿病小鼠中, 相比 WT 组小鼠, DKO 组小鼠肾脏组织中的 CCR2 的表达稍有降低, 而 STZ-WT 组小鼠的 CCR2 表达明显增强; 与 STZ-WT 组相比, 敲除 DDIT4 的小鼠肾脏组织中 CCR2 表达下降。db/db 糖尿病小鼠中, 与 db/m 组小鼠相比, db/db 小鼠肾脏组织中 CCR2 的表达明显增强; 与 db/db 组相比, 敲低 DDIT4 的小鼠肾脏组织中 CCR2 表达明显下降。

结论:

1. DDIT4 在高糖培养的肾小管上皮细胞, 1/2 型糖尿病小鼠肾脏组织, 以及糖尿病肾病患者肾脏组织中高表达。

2. 高糖诱导下, DDIT4 通过促进 NLRP3 炎症小体激活介导肾小管上皮细胞焦亡和纤维化反应的发生。

3. DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号通路在糖尿病肾病时被激活, 两两之间存在正相关。

关键词: 糖尿病肾病, DNA 损伤诱导因子 4, NLRP3 炎症小体, 细胞焦亡, C-C 基序趋化因子受体 2

The role and mechanism of DDIT4 in renal tubular cells pyroptosis of diabetes nephropathy

ABSTRACT

Objective: Diabetes nephropathy (DN) is the main cause of end-stage renal disease. Based on the poor effect and unclear pathogenesis, it is urgent to explore the precise molecular mechanism of disease progression related to DN treatment strategies and find potential therapeutic targets.

DDIT4, as a key stress regulating protein, is involved in cell growth, apoptosis, metabolism, and oxidative stress, and is associated with various metabolic diseases. However, the role of DDIT4 on diabetes nephropathy has only been reported individually, and the specific mechanism is still unclear.

Pyroptosis is an inflammatory programmed cell death characterized by cell swelling, rupture, secretion of cellular contents, and significant pro-inflammatory effects. Inflammation and cell damage caused by pyroptosis are closely related to the progress of DN, which can aggravate renal fibrosis, glomerulosclerosis and tubular damage. However, it is still unclear about the specific mechanism that inducing cell pyroptosis followed by tubular cell fibrosis. The core of pyroptosis is the activation of NLRP3 inflammasome, one core molecule of which is NLRP3. As an inflammatory and immune related disease, A large amount of evidence supports that the inflammatory components of renal tubulointerstitium, especially those of proximal tubular epithelial cells, play a central role in the pathogenesis of DN. CCR2 is expressed on monocytes, myeloid precursor cells and T cells, dendritic cells, and various tissue parenchymal cells, and is a chemical inducer of pro-inflammatory responses.

In this study, human renal tubular epithelial HK-2 cells, type 1/2 diabetes mouse models, and clinical DN patients' biopsy samples were used. We explored the role and regulatory mechanism of DDIT4 in DN by in vivo or in vitro experiments, and clinical samples detection, which can provide experimental basis of exploring new targets for the DN prevention and

treatment.

Methods:

1. High glucose (30 mmol/L glucose, HG) was used to stimulate HK-2 cells at different time points, and the DDIT4 mRNA and protein, and NLRP3/Caspase-1/GSDMD inflammatory signaling pathway were detected. based on the above results, selected the optimal time point for HG stimulation. And then detected cell membrane integrity through AO/EB, analyzed cell membrane damage through LDH activity detection, detected cell viability through CCK-8, detected cell proliferation activity through EDU, and detected the occurrence of cell pyroptosis through FLICA/PI immunofluorescence confocal and flow cytometry. Western blot and immunofluorescence were used to detect the expression of DDIT4, GSDMD, key components of NLRP3 inflammasome, and the indicators of renal fibrosis in diabetes, FN1 and Collagen I.

2. In HK-2 cells, knockdown or overexpression DDIT4 were performed, and followed by HG stimulation for 48 hours. Divided into NG group, M group, HG group, HG+NC group (knockdown negative control group with HG stimulation), HG+shDDIT4 group (DDIT4 knockdown group with HG stimulation); Or NG group, M group, HG group, HG+vector group (overexpression negative control group with HG stimulation), HG+_DDIT4 group (DDIT4 overexpression group with HG stimulation). By AO/EB dual staining, LDH activity detection, CCK-8, EDU, FLICA/PI immunofluorescence confocal, flow cytometry, western blot, and immunofluorescence, the effects of intervention with DDIT4 on pyroptosis, fibrosis and the activation of NLRP3 inflammasomes in HK-2 cells under HG environment were detected.

3. In STZ-induced diabetes mice, we explored the regulatory role of DDIT4 knockout on pyroptosis, diabetes kidney injury, and NLRP3 inflammasomes. Divided into four groups, WT group (injected with citrate buffer), WT-DKO Group (injection of citrate buffer), STZ-WT group (intraperitoneal injection of 50 mg/kg/day STZ, continuous Continuation of 5 days) and STZ-DKO group (intraperitoneal injection of 50 mg/kg/day STZ for

5 consecutive days). Masson and PAS staining were used to observe renal pathological changes in mice. Collected blood and urine specimens and tested biochemical indicators changes in the subject matter. Western Blot and immunohistochemical were used to detect the expression changes of pyroptosis executive protein, GSDMD, fibrosis indicators FN1 and Collagen I, and key components of NLRP3 inflammasome.

4. In db/db diabetes mice, we explored the regulatory role of DDIT4 knockout on pyroptosis, diabetes kidney injury, and NLRP3 inflammasomes. 18 db/db mice at 8 weeks old, and 6 healthy male littermate control db/m mice were selected. Situ renal pelvis injection was performed, and adeno-associated virus AAV-9 was transfected to knocked down DDIT4. Grouping: db/m group, db/db group (no treatment), db/db control group (right renal pelvis in situ injection of HBAAV2/9-*luc* NC control), shDDIT4 group (right renal pelvis in situ injection of HBAAV2/9-m-DDIT4shRNA-*luc*, shDDIT4 sequence: TTCTCCGAACGTCACGTAA). After 8 weeks of surgery, samples were taken and changes in metabolism (body weight, kidney weight, and blood glucose) and biochemical indicators (BUN, Scr, UAE, and UACR) were detected in each group of mice. Masson and PAS staining were used to observe renal pathological changes. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression changes of DDIT4, pyroptosis executive protein (GSDMD), fibrosis indicators (FN1 and Collagen I), and key components of NLRP3 inflammasome.

5. In HK-2 cells, we explored the mechanism of pyroptosis induced by DDIT4 through upregulating NLRP3 with HG stimulation. Immunofluorescence confocal was used to detect the co-localization between DDIT4 and NLRP3. Constructed NLRP3-crispr plasmid, and both DDIT4 overexpression and NLRP knockdown were performed in HK-2 with HG stimulation. The AO/EB dual staining, LDH activity detection, CCK-8, EDU assay, FLICA/PI immunofluorescence confocal assay, western blot, and immunofluorescence assay were used to observe the changes of pyroptosis, fibrosis and NLRP3 inflammasome in HK-2 cells. Furthermore, under HG

conditions, both DDIT4 overexpression and NLRP3 selective inhibitor MCC950 were used, and then detected the changes of pyroptosis, fibrosis and NLRP3 inflammasome in HK-2 cells.

6. Three renal tubular expression profiles about DN from GEO database were downloaded, and then compared DDIT4 expression between DN patients and controls, and the capacity of DDIT4 to differentiate DN from controls were analyzed by the ROC curve. Further, 40 biopsy specimens from DN patients and 30 control tissues were collected. Immunohistochemistry was used to detect the expression of DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 inflammatory signaling pathway in serial sections, and then ROC curve analysis and correlation analysis were performed. In addition, the expression levels of DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 and their relationship with clinical parameters were analyzed in 30 specimens of DN patients with complete clinical information.

7. Western Blot and immunohistochemistry were performed on type 1/2 diabetes mice to measure CCR2 in kidney tissues after knocking out or knocking down DDIT4.

Results:

1. Under HG stimulation, the changes of DDIT4, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, as well as cell pyroptosis and fibrosis response in renal tubular epithelial cells (HK-2 cells).

Under HG stimulation, there were increased DDIT4 mRNA and protein of HK-2 cells in a time-dependent manner, reaching a peak at 48 hours. Similarly, the NLRP3/Caspase-1/GSDMD inflammatory signaling pathway exhibited time-dependent activation, reaching its peak at 48 hours. Therefore, the optimal time point for the following experiment is at 48 hours after HG stimulation. Different conditions with NG (normal glucose, 5.6 mmol/L glucose), or M (hypertonic control group, 5.6 mmol/L glucose+24.4 mmol/L mannitol), or HG (high glucose group, 30 mmol/L glucose) intervened HK-2 cells for 48 hours, AO/EB dual staining showed enhanced orange fluorescence staining in HK-2 cells with HG stimulation, indicating the cell membrane integrity damage. The detection results of lactate dehydrogenase (LDH) activity showed that the LDH

released by HK-2 cells under HG stimulation were significantly increased, indicating the cell membrane rupture. The results of CCK-8 showed that the cell viability was significantly reduced under HG stimulation. The results of EDU detection showed a decrease in the proportion of EDU staining in HK-2 cells under HG stimulation, indicating a weakened proliferation activity of HK-2 cells. The immunofluorescence confocal analysis of FLICA (active Caspase-1) and PI double staining showed that compared with the NG group, cells in the HG group had a 1.07-fold increase in the number of cells undergoing pyroptosis (FAM-YVAD-FMK and PI double positive staining). The results of flow cytometry showed an increase in the proportion of cells undergoing pyroptosis in the HG group. Western blot results showed that the proteins related to pyroptosis and fibrosis in high glucose stimulated HK-2 cells, such as NLRP3, Pro-caspase-1, Caspase-1 P20, GSDMD-FL (the full length of GSDMD), GSDMD-N (the active fragment of GSDMD), ASC, IL-1 β , IL-18, FN1 and Collagen I were significantly increased. Immunofluorescence showed that with HG stimulation, the fluorescence intensity of NLRP3, GSDMD, Caspase-1, FN1, and Collagen I were increased in HK-2 cells.

2. In HK-2 cells, the effects of knocking down or overexpressing DDIT4 on cell pyroptosis, fibrosis response, and NLRP3 inflammasome activation were investigated.

Compared with the HG group, there were a weakened orange red fluorescence staining detected by AO/EB dual staining, decreased LDH release, increased cell viability and proliferation activity, decreased proportion of FLICA⁺/PI⁺ cells, decreased proportion of cell pyroptosis detected by flow cytometry, and decreased expression of GSDMD (full length and active fragment), fibrosis indicators (FN1 and Collagen I) and NLRP3 inflammasome components (NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1-p20, ASC, IL-1 β (precursor), IL- β (mature), and IL-18) in HK-2 cells with DDIT4 knockdown. On the contrary, the above phenomena were exacerbated and the related proteins expression were enhanced in HK-2 cells with overexpressed DDIT4.

3. In STZ-induced diabetes mice, the regulatory effect of DDIT4 knockout

on cell pyroptosis, diabetic renal injury and NLRP3 inflammasome activation were investigated.

Compared with WT group, the glomerular volume became larger, the mesangial matrix increased, and the basement membrane was irregularly thickened in STZ-induced diabetes mice. The morphological structure of glomeruli and renal tubules was significantly improved in STZ-DKO group mice. Compared with WT group, body weight (BW), kidney weight (KW), UAE, UACR, BUN and Scr of mice in STZ-WT group were significantly higher, and BW was significantly lower. Compared with the STZ-WT group, the levels of blood glucose (BG), UAE, UACR, BUN, and Scr of mice in the STZ-DKO group were significantly reduced. In addition, compared with the WT group, the expression levels of GSDMD-FL and GSDMD-N, fibrosis related proteins (FN1 and Collagen I), as well as NLRP3 inflammasome components (NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1-p20, ASC, IL-1 β (precursor), IL- β (mature)) in the renal tissue of STZ-WT group mice were significantly increased, while knocking out the DDIT4 resulted in a decrease in these proteins.

4. In db/db diabetes mice, the regulatory effect of DDIT4 knockout on cell pyroptosis, diabetic renal injury and NLRP3 inflammasome activation were investigated.

Compared to the db/m mice, DDIT4 exhibited extensive cytoplasmic staining in the kidney tissue of db/db and db/db-control mice. Compared with db/m mice, it showed a significant increase in glomerular volume, widened mesangial area, and increased mesangial matrix in the db/db and db/db-control mice. After knocking down DDIT4, the above symptoms were significantly improved. It showed that compared with the db/m mice, the BW and BG of the db/db and db/db-control mice were increased significantly, and BG levels were both higher than 16.7mmol/L. And there were no significant changes in KW among them. UAE, UACR, BUN, and Scr were also significantly increased in the db/db group and db/db-control group. After knocking down DDIT4, the above metabolic indicators in db/db mice were significantly reduced. In addition, compared with db/m mice, the expression levels of GSDMD-FL and

英文摘要

GSDMD-N, fibrosis related proteins (FN1 and Collagen I), as well as NLRP3 inflammasome components (NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1-p20, ASC, IL-1 β (precursor), IL- β (mature)) were significantly increased in the kidney tissue of db/db group mice. while knocking down the DDIT4 resulted in a decrease in these proteins (pro-Caspase-1 and IL-1 β (precursor) showed a decreasing trend).

5. In HK-2 cells, the mechanism of DDIT4 mediated cell pyroptosis by upregulating NLRP3 in HG environments was explored.

The immunofluorescence co-localization results showed a significant the co-localization between DDIT4 and NLRP3 in HK-2 cells under HG stimulation. Under HG stimulation, compared to HK-2 cells with overexpressing DDIT4 alone, HK-2 cells transfected with both DDIT4 overexpression plasmid and NLRP3-crispr plasmid simultaneously showed alleviated cell membrane integrity damage, reduced LDH release, and effectively restored cell viability and proliferation activity, and decreased FLICA⁺/PI⁺ cells. The GSDMD-FL, GSDMD-N, NLRP3, pro-Caspase-1 and Caspase-1 p20, ASC, IL-1 β (precursor), IL-1 β (mature), FN1 and Collagen I were significantly reduced. Similarly, compared to HK-2 cells with overexpressing DDIT4 alone, HK-2 cells with DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibitor MCC950 showed the similar trend of changes.

6. The expression and correlation analysis of DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 in GEO datasets and clinical pathological sections of DN.

Three datasets related to tubulointerstitial injury in patients with DN, GSE47184, GSE104954 and GSE99325 from the GEO database, were download. In the three datasets, there were significant up-regulated expression of DDIT4 in the DN group than the Controls, and the AUC of DDIT4 in the three datasets were 0.917, 0.894, and 0.843, respectively, calculated by ROC analysis. In the collected biopsy tissues of 40 patients with DN and 30 controls, immunohistochemical detection showed that the expression of DDIT4, NLRP3, GSDMD and CCR2 was significantly enhanced in the renal tissues of DN patients. ROC curve analysis showed that DDIT4, NLRP3, GSDMD and CCR2 had a high differential diagnosis ability for DN. In addition, there are high

positive correlation among the four factors in DN group. The correlation analysis in 30 DN patients with complete clinical information showed that it was no relationship between the expression levels of DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 and gender, grade, disease course, BMI, FBG, SBP, DBP, HbA1c (%), UA, TC, TG, LDL of DN patients. DDIT4 was significantly positively correlated with Urea nitrogen and Scr, and negatively correlated with Hb and eGFR. NLRP3 was significantly positively correlated with age, Scr, 24-hour proteinuria, and negatively correlated with Hb and eGFR. GSDMD was significantly positively correlated with Urea nitrogen, Scr, 24-hour proteinuria, and negatively correlated with eGFR. CCR2 was significantly positively correlated with age and Scr, and negatively correlated with Hb, Alb, and eGFR.

7. In type 1/2 diabetes mice, the effect of knocking out or knocking down DDIT4 on CCR2 in kidney tissues.

Compared with WT group, CCR2 in kidney tissue was slightly reduced in DKO group, while CCR2 was significantly increased in STZ-WT group mice. Compared with the STZ-WT group, CCR2 in the kidney tissue of DDIT4 knockout mice (STZ-DKO group) was decreased. Compared with db/m mice, CCR2 was significantly increased in kidney tissue of db/db diabetes mice. And compared with the db/db group, CCR2 in the kidney tissue in db/db-shDDIT4 group was significantly reduced.

Conclusions:

1. The expression of DDIT4 in renal tubular epithelial cells under HG stimulation, kidney tissue of type 1/2 diabetes mice, and kidney tissue of DN patients were increased significantly.

2. Under HG conditions, DDIT4 can induced renal tubular epithelial cells pyroptosis and fibrosis reaction by activating NLRP3 inflammasome.

3. DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 inflammatory signaling pathway was activated in diabetes nephropathy, and there was high positive correlation among them.

Keywords: DN, DDIT4, pyroptosis, NLRP3 inflammasome, CCR2

英文缩写

英文缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
DDIT4	DNA damage-inducible transcript 4	DNA 损伤诱导因子 4
GSDMD	gasdermin D	gasdermin 家族蛋白 D
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3	含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3
ASC	PYCARD, PYD and CARD domain containing	包含 PYD 和 CARD 域蛋白
Caspase-1	Cysteine-aspartic acid protease 1	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1
IL-1 β	Interleukin-1 β	白介素-1 β
IL-18	Interleukin-18	白介素-18
FN1	Fibronectin 1	纤连蛋白 1
Col-I	Collagen type I	I 型胶原蛋白
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2	C-C 基序趋化因子受体 2
DN	Diabetes nephropathy	糖尿病肾病
DM	Diabetes mellitus	糖尿病
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4,6-联脒-2-苯基吲哚
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
WT	wild type	野生型
HK-2	human renal proximal tubular cells	人肾小管上皮细胞
Hb	hemoglobin	血红蛋白
FBG	Fibrinogen	纤维蛋白原
SBP	Systolic blood pressure	收缩压
DBP	Diastolic blood pressure	舒张压
HbA1c	Hemoglobin A1c	糖化血红蛋白
Alb	albumin	白蛋白
Scr	Serum creatinine	血清肌酐

英文缩写

eGFR	Estimated glomerular filtration rate	估计肾小球滤过率
UACR	Urine albumin/creatinine ratio	尿白蛋白肌酐比值
TC	total cholesterol	总胆固醇
TG	Triglyceride	甘油三酯
LDL	Low-Density Lipoprotein	低密度脂蛋白
UA	urine acid	尿酸
BUN	blood urea nitrogen	血尿素氮
UAE	urine albumin excretion	尿蛋白排泄率
BW	Body weight	体重
KW	Kidney weight	肾重
BG	Blood glucose	血糖
PAS	Periodic Acid - Schiff staining	过碘酸雪夫氏染色
IHC	immunohistochemical	免疫组织化学
ROC	Receiver operating characteristic curve	受试者工作特征曲线
NG	Normal glucose	正常糖
HG	High glucose	高糖
M	mannitol	甘露醇
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
IF	Immunofluorescence	免疫荧光

DDIT4 在糖尿病肾病肾小管细胞焦亡中的作用及机制研究

引言

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 主要是因胰岛素分泌绝对或相对分泌不足和 (或) 胰岛素作用缺陷所导致的, 以高血糖为特征的、可造成全身多个组织、脏器损害的代谢性疾病。其发病率在全球范围内呈日益增长之势, 目前患病人数高达 5.37 亿。除常见的大血管病变外, 微血管并发症亦呈高发状态。糖尿病肾病 (Diabetes nephropathy, DN) 约占糖尿病的 30%~40%, 是糖尿病最常见和最具危害的微血管并发症之一, 是世界范围内目前终末期肾病 (End-stage renal disease, ESRD) 的主要原因。提高对 DN 致病机制的理解和探索对于开发治疗 DN 的新策略具有重要意义。

糖尿病肾病发病机制的传统理论强调肾小球是高血糖引起损伤的主要肾区室, 而肾小管间质损伤是一种继发性或晚期病变。但在过去十年中, 早期糖尿病肾病的小管病变越来越被认为是一种 DN 进展的关键组成部分。由于越来越多的证据支持肾小管损伤在 DN 中的作用, 人们的兴趣已经转移到近端小管, 近端小管可能在糖尿病条件下肾脏疾病的早期发病机制中起到引发、驱动或贡献者的作用。DN 肾小管损伤的机制是复杂的, 了解肾小管损伤机制可能有助于对 DN 进行新的治疗干预。

病理学上, DN 的特征可分为肾小球病变和肾小管间质改变, 其病理特征包括肾小球系膜扩张、基底膜增厚、足细胞丢失、结节性肾小球硬化和内皮细胞破坏。DN 早期有肾小管肥大, 但最终发展为间质纤维化伴肾小管萎缩。肾小管间质纤维化已被认为是 DN 患者肾脏预后的主要决定因素。肾小管间质纤维化主要病理改变表现为间质炎症细胞的大量积聚、细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 沉积以及肾小管上皮细胞转分化等。

作为一种炎症和免疫相关疾病, 肾脏炎症在 DN 的发展和进展中起着非常重要的作用, 肾组织的持续炎症是 DN 发展的重要病理生理基础。已证实 DN 与全身和局部肾脏炎症相关, 炎症细胞浸润, 进而释放细胞因子、趋化因子和活化补体进入糖尿病肾脏, 从根本上改变肾脏微环境。目前, DN 患者尚无靶向药物治疗, 靶向炎症反应有望转化为 DN 治疗药物, 这也是研究 DN 药物的热点方向。肾脏中的慢性非消退性炎症驱动纤维化反

应，持续性炎症触发促纤维化信号级联反应。由此可见，慢性炎症以及随后发生的纤维化是导致 DN 持续进展的关键过程。

细胞焦亡是一种促炎程序性细胞死亡，即由炎症激活引发，炎症反过来释放大量炎症因子，在炎症小体中，细胞不断膨胀，直到细胞膜破裂，导致细胞内容物释放，引发强烈的炎症反应。已知常见的焦亡由两种炎症途径介导，经典途径（Caspase-1, Cysteine-aspartic acid protease 1, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 依赖性）和非经典途径（Caspase-4, 5, 11, Cysteine-aspartic acid protease 4, 5, 11, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 4, 5, 11 依赖性）。经典途径引发的焦亡的主要特征是 Caspase-1 的激活，GSDMD (gasdermin D, gasdermin 家族蛋白 D) 的裂解。涉及四个主要步骤，即炎症小体组装、前半胱氨酸蛋白酶-1 (pro-Caspase-1) 的激活、GSDMD 的切割以及 IL-1 β 和 IL-18 的释放。在细胞焦亡的过程中，GSDMD 是焦亡的执行者，GSDMD 由两个保守结构域组成：C-末端抑制结构域和 N-末端效应结构域。GSDMD 的 N-末端具有细胞毒性，并通过与质膜中的脂质成分结合形成孔，而 GSDMD 全长结构不具有细胞毒性。GSDMD 被切割后，释放 GSDMD-N 片段的活性形式，在细胞膜中低聚产生孔，细胞膜通透性增加，释放细胞内容物和炎症因子（IL-1 β 和 IL-18 等），引起炎症反应，介导细胞焦亡。

这个过程中，炎性小体的激活是细胞焦亡过程的关键。NLRP3 炎症小体是研究最深入的炎症小体之一，与不受控制的炎症反应密切相关。NLRP3 与多种炎症疾病直接相关，并在代谢性疾病的发病机制中发挥双重作用。NLRP3 在炎症反应中作为一个重要的分子，已被证实在糖尿病肾病中有重要作用。

越来越多的研究证明焦亡相关炎症小体通路在糖尿病及其并发症的病理生理学中起着重要作用。DN 的发展进程和细胞焦亡之间的联系已被证实，但具体触发机制仍不十分清楚。

DNA 损伤诱导因子 4 (DNA damage-inducible transcript 4, DDIT4)，也称为 REDD1 或 RTP801，是一种被不同应激条件激活的，即时早期反应基因，被缺氧、DNA 损伤和氧化等引起的应激反应诱导转录并翻译。作为一种应激诱导蛋白，其表达受特定转录因子的精细调节，包括 HIF-1、p53 或 ATF4-C/EBP β 6-9。DDIT4，已明确的功能是通过抑制哺乳动物雷

帕霉素靶蛋白抑制增殖信号传导和调节代谢。DDIT4 参与细胞生长、凋亡、代谢和氧化应激，暗示其在各种病理生理功能中的作用，包括癌症和炎症性疾病。迄今为止，DDIT4 与糖尿病肾病的相关研究仅少见报道，具体机制尚不明确，而 DDIT4 在糖尿病肾病中对肾小管上皮细胞焦亡的调控，尚未见报道。另外，已有文章证实 DDIT4 在骨髓来源的巨噬细胞和表皮脂肪组织中，是控制脂多糖介导的炎症的关键因素，DDIT4 的缺失延缓了炎症的发展，这与抑制 p38MAPK、JNK、NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体的激活有关，提示 DDIT4 和 NLRP3 在炎症反应中存在调控作用。但是关于 DDIT4 和 NLRP3 在糖尿病肾病的调控作用尚未见报道。

大量证据支持肾小管间质的炎性成分，特别是近端肾小管上皮细胞的炎性成分，在糖尿病肾病的发病机制中起核心作用。CCR2，即 C-C 基序趋化因子受体 2，位于 3 号染色体上，是 G 蛋白偶联受体超家族的成员，也是单核细胞趋化蛋白 1~4 的受体，是促炎症反应的化学诱导剂。有研究发现，GSDMD 介导的肝细胞焦亡可通过增加 CCR2 的表达来加重急性肝损伤程度，提示了 GSDMD 与 CCR2 存在调控关系，但是在糖尿病肾病中的调控作用尚未见报道。

基于上述背景及假设，本研究将明确 DDIT4 在糖尿病肾病中的表达与作用，利用细胞培养、动物实验，以及临床糖尿病肾病患者活检标本，探讨了 DDIT4 在 DN 进展中发挥的作用及其具体机制，为进一步阐明糖尿病肾病的发病机制和寻找新的治疗靶点提供理论依据。

第一部分

DDIT4 在糖尿病肾病肾小管细胞焦亡和肾纤维化中的作用

前 言

糖尿病肾病是糖尿病患者中最常见也是最严重的微血管病并发症之一，同时是终末期肾病及导致 1/2 型糖尿病患者死亡的主要原因，发病率和死亡率不断上升，引起越来越多人的重视^[1]。目前糖尿病肾病的确切发病机制尚未明确，治疗效果并不理想。延缓甚至逆转慢性肾病的进展是一个提高预后的可行方向。

肾脏炎症和肾纤维化的增加在 DN 的发生和发展中起着关键作用^[2]。肾纤维化是糖尿病肾病晚期的一个突出病理特征，显著增加了晚期糖尿病患者的死亡率。肾纤维化以细胞外基质的过度积累和沉积（如肾小球和肾小管间质中的纤连蛋白（FN1）和各种胶原蛋白等）为特征，是几乎所有晚期慢性肾病常见的最终途径。这是一个复杂的过程，在慢性持续损伤后，肾组织的伤口愈合不成功，导致肾脏结构的渐进性破坏和肾功能的丧失。

细胞焦亡是一种特殊类型的裂解性和炎症性程序性细胞死亡，其特征是细胞肿胀、破裂、细胞内容物分泌和显著的促炎作用^[3]。细胞焦亡是一种重要的免疫反应，与传染病、心血管疾病、神经系统相关疾病、肿瘤和糖尿病密切相关。目前已有研究报道了高血糖诱导的细胞应激在肾细胞焦亡中的刺激作用，并且不同的信号通路已被证明可以调节焦亡的发生^[3]。此外，焦亡引起的炎症和细胞损伤与 DN 的进展密切相关，加重肾纤维化、肾小球硬化和肾小管损伤，但是糖尿病肾病中，有关焦亡和肾脏纤维化的具体机制的尚不明确。

DDIT4，也被称为 REDD1 或 RTP801，DDIT4 初始被定义为缺氧诱导因子，是一种关键的压力调节蛋白^[4]。DDIT4 定位于细胞质、细胞核、和细胞膜^[5]。除此之外，有研究在 HEK-293T 细胞^[6]和视网膜神经节 RGC-5 细胞^[7]的线粒体中检测到 DDIT4 的存在。低水平的 DDIT4 在人体正常组织广泛表达，面对各种细胞应激如缺氧、能量压力、ATP 缺失、细胞铁缺乏、内质网压力和多种 DNA 损害时，DDIT4 表达随之升高^[8]。DDIT4

的异常表达涉及多种疾病的发生,包括阿尔茨海默病、缺血增殖性视网膜炎和其他疾病等。日益增多的报道证实, DDIT4 和糖尿病及其并发症有关。DDIT4 在 2 型糖尿病肥胖个体的骨骼肌中高表达, 且与胰岛素导致的葡萄糖利用减少以及调节细胞葡萄糖摄取、脂质代谢和生长的信号激活减弱有关^[9]。Nora K. M 等^[10]发现 1 型糖尿病的大鼠体内较未患糖尿病大鼠 DDIT4 表达高。Michael D. Dennis 团队在高脂肪高蔗糖喂食的小鼠中, 发现心脏 DDIT4 的高表达促进心肌细胞炎症的发展^[4]。Michael D Dennis 报道 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠 16 周后, 小鼠视网膜中 DDIT4 表达增加, DDIT4 对于糖尿病诱导的促炎细胞因子表达至关重要^[11]。迄今为止, DDIT4 与糖尿病肾病的相关研究仅个别报道, 具体机制尚不明确。然而, 在糖尿病肾病中, DDIT4 对肾小管上皮细胞焦亡和肾脏纤维化的作用, 尚未见报道。

材料与方法

1. 材料

1.1 仪器

超低温冰箱	中国 Haier 公司
CO2 培养箱	美国 Thermo Scientific 公司
纯水机	美国 Millipore 公司
一次性塑料培养瓶	无锡耐思生命科技有限公司
Nanodrop 2000 分光光度计	美国 Thermo Scientific 公司
实时定量 PCR 仪	BioRad
细胞培养超净工作台	ESCO 公司
纯水机	美国 Millipore
液氮罐	中科都菱
移液器	Eppendorf
恒温磁力搅拌器	上海梅颖浦仪器仪表制造公司
轮转式石蜡组织切片机	德国徕卡公司
组织脱水机	德国莱卡公司
组织包埋机	德国莱卡公司

旋涡混合器	海门市其林贝尔仪器制造公司
压力蒸汽灭菌器	重庆雅马拓科技有限公司
电热恒温鼓风干燥机	上海姚氏仪器设备厂
电子恒温水浴锅	天津市泰斯特仪器有限公司
微波炉	格兰仕
电磁炉	美的
电子天平	梅特勒-托利多有限公司
台式 pH 计	安莱立思仪器有限公司
垂直电泳仪	美国伯乐公司
转印电泳仪	美国伯乐公司
垂直电泳槽	中国韦克斯/美国伯乐公司
转印电泳槽	中国韦克斯/美国伯乐公司
ChemiDoc MP 凝胶成像系统	美国伯乐公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司
T100 Thermal Cycler PCR 仪	美国伯乐公司
电热恒温金属浴	常州市国旺仪器公司
制冰机	郑州南北仪器设备有限公司
微波炉	中国美的
高压灭菌锅	日本雅马拓
酶标仪	TECAN
超净工作台	苏州净化设备公司
光学倒置显微镜	德国蔡司公司
正置荧光显微镜	德国蔡司公司
RT-9600 半自动生化分析仪	美国雷杜公司
小鼠血压检测仪	美国 Matrx 公司
血糖分析仪	德国罗氏公司

1.2 主要试剂

Opti-MEM	北京索莱宝
RPMI 1640 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清 (FBS)	美国 Gbico 公司
胰蛋白酶	美国 Sigma 公司

青链霉素混合液	北京 Solarbio 公司
EDTA-胰酶混合物	北京 Solarbio 公司
EdU-488 试剂盒	广州瑞博有限公司
DDIT4-shRNA 质粒	上海吉玛公司
DDIT4 质粒	载体家（云州生物）
链脲佐菌素（STZ）	美国 Sigma 公司
兔抗 DDIT4 多克隆抗体	武汉 proteintech 公司
兔抗 NLRP3 多克隆抗体	MCE 公司
兔抗 GSDMD 多克隆抗体	Affinity Biosciences 公司
鼠抗 GSDMD 单克隆抗体	武汉 proteintech 公司
兔抗 FN1 多克隆抗体	Abcam 公司
鼠抗 Collagen I 单克隆抗体	Abcam 公司
兔抗 Collagen I 单克隆抗体	武汉 proteintech 公司
鼠抗 β -actin	苏州博奥龙
CoraLite488-山羊抗鼠 IgG	武汉 proteintech 公司
CoraLite488-山羊抗兔 IgG	武汉 proteintech 公司
PolyFast Transfection Reagent	MCE 公司
转染试剂 Lipofectamine 3000	美国 Invitrogen
Realtime PCR 试剂	翌圣生物科技（上海）
RNA 反转录试剂	翌圣生物科技（上海）
PV9000 通用二步法检测试剂盒	北京中杉金桥公司
TRIzol reagent	ThermoFisher Scientific 公司
蛋白质 marker	翌圣生物科技（上海）
Realtime PCR 试剂盒	翌圣生物科技（上海）
Cell Counting Kit-8	MCE 公司
FAM-FLICA 试剂盒	ICT 公司
小鼠源性 GAPDH 抗体	武汉 proteintech 公司
小鼠源性 β -actin 抗体	武汉 proteintech 公司
小鼠源性 β -Tublin 抗体	北京博奥森公司
山羊抗小鼠二抗	中山金桥生物技术有限公司
山羊抗兔二抗	中山金桥生物技术有限公司

二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒	北京中杉金桥公司
高敏 ECL 化学发光试剂盒	白鲨生物
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京 Solarbio 公司
蛋白酶抑制剂	北京 Solarbio 公司
PVDF 膜	美国 Milipore 公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	北京 Solarbio 公司
甘氨酸 (Glycine)	北京 Solarbio 公司
十二烷基磺酸钠 (SDS)	北京 Solarbio 公司
丙烯酰胺 (ACR)	北京 Solarbio 公司
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	北京 Solarbio 公司
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	北京 Solarbio 公司
苯甲磺酰氟 (PMSF)	德国 Boehringer 公司
TritonX-100	碧云天生物技术公司
二硫苏糖醇 (DTT)	美国 Sigma 公司
过硫酸铵	美国 Sigma 公司
TEMED	美国 Sigma 公司
脱脂奶粉	美国 R&D 公司
二甲苯	中国阿拉丁公司
RIPA 裂解液	北京 Solarbio 公司
溴酚蓝	北京 Solarbio 公司
Masson 染色试剂盒	北京 Solarbio 公司
PAS 染色试剂盒	北京 Solarbio 公司
苏木素伊红 (HE)染色试剂盒	上海翌圣生物公司
AO/EB (吖啶橙溴化乙锭) 染色	北京 Solarbio 公司
乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
肌酐测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
甘油三脂测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
总胆固醇测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
血糖测定试剂盒	南京建成生物工程研究所

1.3 试剂配制

1.3.1 0.01mol/L 柠檬酸抗原修复液 (pH6.0):

A 液 (0.1 mol/L 柠檬酸): 2.101 g 柠檬酸溶解于 100 mL 蒸馏水;
 B 液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠): 2.941 g 柠檬酸钠溶解于 100 mL 蒸馏水;
 A 液 (3.6 mL) 与 B 液 (16.4 mL) 混合后加蒸馏水定容至 200 mL,
 即为 0.01 mol/L 柠檬酸抗原修复液 (pH 6.0)。

1.3.2 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.5) 的配制

A 液 (0.1 mol/L 柠檬酸): 2.101 g 柠檬酸溶解于 100 mL 蒸馏水;
 B 液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠): 2.941 g 柠檬酸钠溶解于 100 mL 蒸馏水;
 按照 A 液: B 液=14: 11 比例, 配制成终浓度为 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

1.3.3 链脲佐菌素 (STZ) 的配制

STZ 剂量为 100 mg/支, 加入 10 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 4.5) 溶解, 终浓度为 10 mg/mL, 整个配置过程需要避光操作, 该试剂现用现配。

1.3.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制

称量 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂PO₄ · H₂O 1.56 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 加入 1000 mL 蒸馏水充分溶解。

1.3.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 浓缩胶的配制

具体配方如下:

表 1-1 SDS-PAGE 浓缩胶的配制

Table 1-1 Preparation of SDS-PAGE concentrated gel

5%浓缩胶	2 mL	3 mL	4 mL	6 mL
ddH ₂ O	1.4	2.1	2.7	4.1
30% Acr-Bis (29: 1)	0.33	0.5	0.67	1.0
1M pH 6.8 Tris-HCl	0.25	0.38	0.5	0.75
SDS (10%)	0.02	0.03	0.04	0.06
AP (10%)	0.02	0.03	0.04	0.06
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.006

1.3.6 SDS-PAGE 分离胶的配制

表 1-2 8%SDS-PAGE 分离胶的配制

Table 1-2 Preparation of 8% SDS-PAGE separation gel

8%分离胶	5mL	10mL	15mL	20mL
-------	-----	------	------	------

研究论文

ddH ₂ O	1.7	3.3	5.0	6.7
30%Acr-Bis (29: 1)	1.3	2.7	4.0	5.3
1.5M pH 8.8 Tris-HCl	1.9	3.8	5.7	7.6
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
AP (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02

表 1-3 10%SDS-PAGE 分离胶的配制

Table 1-3 Preparation of 10% SDS-PAGE separation gel

10%分离胶	5mL	10mL	15mL	20mL
ddH ₂ O	1.7	3.3	4.0	5.3
30%Acr-Bis (29: 1)	1.3	2.7	5.0	6.7
1.5M pH 8.8 Tris-HCl	1.9	3.8	5.7	7.6
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
AP (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02

表 1-4 12%SDS-PAGE 分离胶的配制

Table 1-4 Preparation of 12% SDS-PAGE separation gel

12%分离胶	5mL	10mL	15mL	20mL
ddH ₂ O	1.0	2.0	3.0	4.0
30%Acr-Bis (29: 1)	2.0	4.0	6.0	8.0
1.5M pH 8.8 Tris-HCl	1.9	3.8	5.7	7.6
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
AP (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.005	0.01	0.015	0.02

1.3.7 Western Blot 电泳液的配制

配制 10×Running buffer: Tris base 30.8 g, Glycine 188 g, SDS 10 g 去离子水至 1 L, 常温放置。使用时 100 mL Running buffer, 加入 900 mL 去离子水稀释使用。

1.3.8 Western Blot 转膜液的配制

称量 Tris base 2.42 g, Glycine 11.52 g, 溶于去离子水(不超过 800 mL)中, 再加入甲醇 200 mL, 最后加去离子水定容至 1 L, 4℃冰箱预冷保存。

1.3.9 2×Loading Buffer (10 mL) 的配制

称量蔗糖 0.5 g, 溴酚蓝 0.02 g, 加入 10% SDS 2 mL, β -巯基乙醇 0.5 mL, 去离子水 7.5 mL, 4°C冰箱保存。

1.3.10 Western Blot 洗涤液 (TBST)

称量 Trisbase 30.2 g, NaCl 43.8 g, 一次性注射器吸取 Triton X-100 (0.1%) 5 mL 加入, 将各组分溶于去离子水中, 离子搅拌器搅拌至充分溶解, 用浓盐酸调节 pH 到 7.4, 最后加去离子水定容至 5 L, 室温放置。

2. 实验方法

2.1 细胞培养

细胞株人肾小管上皮细胞 (HK-2), 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。采用完全培养基培养: R1640 培养基+10%FBS+ 1%青链霉素混合液, 置于 37°C、5%CO₂ 细胞恒温箱中培养。

1) 细胞复苏: 水浴锅升温 37°C, 从液氮拿出冻存的细胞, 放入一次性手套里, 立即全部浸入水浴锅中。手在水浴锅里轻轻摇动细胞, 待 2min, 细胞完全溶解。800 rpm 低速离心 5min, 超净工作台中弃上清, 加入配好的 1 mL 完全培养基, 轻轻吹匀后吸入培养瓶, 补齐培养基晃匀放入培养箱。

2) 细胞传代: 细胞密度到达 80%左右时, 弃去培养瓶中的培养基, PBS 清洗 2 遍, 加入 0.25%含 EDTA 胰蛋白酶 37°C培养箱消化 2min 左右, 镜下观察大部分细胞变大变圆, 立即加入 500 μ L 含血清培养基停止消化。弃去消化液, 加入 2 mL 完全培养基, 将细胞吹打成细胞混悬液, 800 rpm 离心 5min, 弃上清。加入 1 mL 完全培养基重悬细胞, 按 1:4 进行传代。

3) 细胞冻存: 按照上述方法消化细胞, 变成细胞混悬液后, 同样条件 800 rpm 离心 5min, 弃上清。加入 1 mL 细胞冻存液 (70%完全培养基+20%FBS+10%DMSO), 吹打混匀, 放入冻存管中, 封口膜封口, 做好标记。放入遇冷的冻存盒于-80°C冰箱 24h, 之后放入液氮罐长期冻存。

4) 高糖诱导细胞: 细胞正常培养 24h, 更换为含高糖 (HG, 30mmol/L 葡萄糖) 培养基。正常糖培养基 (NG, 5.5 mmol/L 葡萄糖) 和高渗培养基 (M, 5.5 mmol/L 葡萄糖+24.5 mmol/L 甘露醇) 作对照。

2.2 转染 DDIT4-shRNA

按照 Lipofectamine 3000 说明书转染 DDIT4-shRNA 及对照组。

1) 铺板: 将 HK-2 细胞进行铺板;

2) 转染: 铺板过夜, 细胞贴壁后即可转染。具体操作为 EP 管 1, 125 μL opti-MEM+lip3000 5 μL ; EP 管 2, 125 μL opti-MEM+P3000 3.75 μL + 目的质粒 5 μL 。室温孵育 5 min, 然后 EP 管 2 混合物加入 EP 管 1 中, 室温孵育 15min。悬空滴加转染混合液至 6 孔板中;

3) 转染 24h 后, 更换高糖培养基, 继续培养进行下一步实验;

4) 具体分组为正常糖对照组 (NG), 高渗对照组 (M), 高糖空白组 (HG), 高糖+转染阴性质粒组 (HG+NC), 高糖+转染敲低质粒组 (HG+shDDIT4)。

2.3 转染 DDIT4 过表达质粒

方法同上。

具体分组: 正常糖对照组 (NG), 高渗对照组 (M), 高糖空白组 (HG), 高糖+转染阴性质粒组 (HG+Vector), 高糖+转染过表达质粒组 (HG+overDDIT4)。

2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

2.4.1 总 RNA 的提取

细胞/组织总 RNA 提取均在冰上进行, 所有耗材均经高压灭 RNA 酶处理。

1) 待提取 RNA 的细胞弃去培养基, 预冷的 PBS 洗两遍, 移液器吸去 PBS(吸干净), 加入 1 mL TRIzol, 充分吹打细胞。收集到 1 mL EP 管中, 冰上 10min, 充分裂解; 如果是组织 RNA 的提取, 加入 1 mL TRIzol 后, 用匀浆机匀浆组织 (冰上进行), 注意不同组织之间匀浆充分清洗机器, 避免交叉污染。12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20min, 取上清至新的 EP 管中。

2) 加入预冷的三氯甲烷 200 μL , 冰上孵育 20min, 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 取上层 RNA 萃取部分至新的 EP 管;

3) 加入 0.8 体积预冷的异丙醇, -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜;

4) 取出样本, 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20min, 弃上清, 留沉淀;

5) 75%乙醇 (无酶灭菌水配制) 洗 2 次, 每次 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 弃上清, 留沉淀;

6) 超净工作台中自然晾干, 加入适量无酶灭菌水溶解。

2.4.2 RNA 浓度测定

Nanodrop 2000 分光光度计测量 RNA 浓度，具体步骤如下：

- 1) Blank: 测浓度前, 先将 1 μL 溶解 RNA 的无酶灭菌水 blank 平衡;
- 2) 浓度测定: 取 1 μL RNA, 检测其浓度和纯度;
- 3) 评估: 根据 OD 260/280nm 比值, 对测 RNA 进行纯度评估, 比值在 1.8-2.2 范围内表示 RNA 纯度较好, 可进行下一步实验。

2.4.3 RNA 逆转录成 cDNA

将上述 RNA 样本, 根据试剂盒说明书进行反转录得到对应的 cDNA, 具体操作步骤如下:

- 1) 去除残留基因组 DNA, 加入体系, 轻柔混合瞬离, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2min;

表 1-5 逆转录反应体系 1

Table 1-5 Reverse transcription reaction system 1

组分	体积/反应体系
模板 RNA (0.1-5 μg)	Variable (2 μg)
5 \times gDNA digester Mix	2 μL
RNase-free water	加到 15 μL

- 2) 逆转录反应液的配制

按照试剂盒说明书继续添加反应混合物, 配制完成后轻柔混合, 瞬离;

表 1-6 逆转录反应体系 2

Table 1-6 Reverse transcription reaction system 2

组分	体积/反应体系
上述反应液	15 μL
4 \times Hifair $^{\text{®}}$ III Super Mix plus	5 μL
总反应体系	20 μL

- 3) 设置逆转录程序: 25 $^{\circ}\text{C}$ →5min; 55 $^{\circ}\text{C}$ →15min; 85 $^{\circ}\text{C}$ →5min;

- 4) 程序结束, 每个 EP 管加入 20 μL 无酶灭菌水, 充分混匀保存。

2.4.4 Realtime PCR

- 1) 反应体系的配制, 充分混匀后离心;

表 1-7 Realtime PCR 反应体系

Table 1-7 Realtime PCR reaction system

组分	体积/反应体系
----	---------

Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox)	10 μL
前引物 (10 μM)	0.4 μL
后引物 (10 μM)	0.4 μL
模板 DNA	2 μL
无酶超纯水	加到 20 μL

2) 将上述反应混合液放入 PCR 仪进行扩增, 反应程序如下:

95°C 5min → [95°C 10s, 55°C 20s, 72°C 20s] × 40 → 95°C 30s → 25°C 30s

3) 计算根据反应测得的 Ct 值进行计算, β-actin/18s 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析不同实验组, 目标基因的相对表达量。

人源引物序列如下:

DDIT4 Forward primer	5'-GAGCCTGGAGAGCTCGGACT-3'
DDIT4 Reverse primer	5'-CTGCATCAGGTTGGCACACA-3'
β-actin Forward primer	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
β-actin Reverse primer	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

鼠源引物序列如下:

DDIT4 Forward primer	5'- TTCGA GAGGCAGA TCGCT -3'
DDIT4 Reverse primer	5'- GAAGAGGAGGACGAGAAACGA -3'
18s Forward primer	5'- ACACGGACAGGATTGACAGA -3'
18s Reverse primer	5'- GGACATCTAAGGGCATCACAG -3'

2.5 细胞免疫荧光染色

1) 对数期 HK-2 细胞计数均匀分入 T12.5 瓶, 过夜贴壁。换上双无培养基, 按照 Lipofectamine 3000 转染试剂的说明书转染, 6h 换上高糖培养基继续培养;

2) 转染 24h 后, 计数分板 (细胞培养玻片), 换上对应的正常糖, 高渗或高糖培养基, 继续培养;

3) 高糖培养 48h 后, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min;

4) 固定: 弃去 PBS, 甲醇室温固定细胞 30min, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min;

5) 打孔: 0.2% Triton X-100 打孔 20min, PBS 清洗 3 次, 每次 5min;

6) 封闭: 5% BSA 室温封闭 30min;

7) 封一抗: 配比对应的一抗 (DDIT4, 1:100; GSDMD, 1:200; FN1,

- 1: 200; Collagen I, 1:200), 湿盒 4°C 封闭过夜;
- 8) 回收一抗, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min;
- 9) 封荧光二抗 (1:100), 37°C, 1h;
- 10) PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min, 含 DAPI 的防猝灭封片剂封片;
- 11) 湿盒晾干, 正置荧光显微镜观察照相。

2.6 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定

根据说明书, 配置不同孔样品, 具体步骤如下:

- 1) 按照下表, 配置反应体系, 具体如下:

表 1-8 LDH 反应体系

Table 1-8 The reaction system of LDH

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水 (μL)	25	5		5
0.2μmol/mL 丙酮酸钠标准液 (μL)		20		
待测样本 (μL)			20	20
基质缓冲液 (μL)	25	25	25	25
辅酶 1 (μL)			5	

- 2) 混匀上述体系, 37°C 温浴 15min。

- 3) 每孔加入 25μL 2,4-二硝基苯肼。

- 4) 混匀, 37°C 温浴 15min。

- 5) 每孔加入 250μL 0.4mol/L NaOH 溶液。

6) 混匀, 室温放置 5min, 酶标仪测定吸光度值 (波长 450 nm), 计算公式如下, LDH 活性 (U/L) = (A 测定 - A 对照) / (A 标准 - A 空白) × C 标准 × N × 1000, N: 样本测试前稀释倍数; C 标准: 标准液浓度, 0.2 μmol/mL; 1000: 单位换算, mL → L。

2.7 AO/EB (吖啶橙/溴化乙锭) 双染

- 1) 对数生长期 HK-2 细胞均匀分瓶, 过夜贴壁转染, 不同糖含量培养基培养, 转染 24h 分入 24 孔板继续培养。

- 2) 不同糖含量培养基培养 48h 后, 弃培养基, PBS 洗两次。

- 3) 配置染色反应液 (1×缓冲液: AO: EB=18:1:1), 弃去细胞中的洗涤液 (注意吸干净), 每孔加入 200 μL 反应液, 室温避光孵育 5~10min。

4) 倒置荧光显微镜下观察, 拍照。

2.8 CCK-8 细胞活力检测

1) 对数生长期 HK-2 细胞六孔板中铺板, 进行敲低/过表达实验, 转染 24h 后, 消化计数, 制备细胞悬液。分组接种于两个 96 孔版中, 3000 个细胞/孔, 加入相应的培养基 200 μ L (NG, M 或者 HG), 5 个复孔。将 96 孔板放回细胞培养箱中继续培养。

2) 24h 后取其中 1 个 96 孔板, 弃培养基, 每孔加入 100 μ L 配好的含有 CCK-8 的双无培养基 (双无培养基: CCK-8 液为 10:1), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2-4h 后用酶标仪进行检测 (吸光度值 450 nm)。

3) 高糖诱导 48h, 取出第二个 96 孔板进行测量。

2.9 EDU 检测细胞增殖

1) 96 孔板中接种细胞, 每孔 1 万-2 万个, 每组设置 3 个复孔;

2) 弃去培养基, 加入 1 \times EDU 溶液, 恒温箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;

3) 孵育完毕后弃去液体, 甲醇室温固定细胞 15-30min, 弃去固定液;

4) 加入 PBS 漂洗细胞 1 次, 弃去漂洗液;

5) 加入 0.5% Triton X-100, 室温孵育 20min, 破膜, 弃去液体;

6) 加入 PBS, 漂洗 2 次, 弃液;

7) 加入反应混合物, 摇床上室温避光 30min, 弃液体, PBS 洗 2 次;

8) 加入 Hoechst 避光孵育 20min, 弃 Hoechst 溶液, PBS 洗 2 次;

9) 荧光显微镜下拍摄照片, 进行统计分析。

3.0 FLICA/PI 免疫荧光共聚焦

1) 工作液配置: FLICA 粉末瞬时离心后, 加入 50 μ L DMSO 配置为 150 \times 储存液, 用 200 μ L PBS 稀释为 30 \times FLICA 工作液体; Apoptosis Wash Buffer (AWB) 稀释: 去离子水将 10 \times AWB 稀释为 1 \times AWB; Hoechst 33342 配置: 现用现配, 体积比为 0.5%; PI 配置: 现用现配, 体积比为 0.5%。

2) 对数期 HK-2 细胞计数均匀分入 T12.5 瓶, 过夜贴壁转染。不同糖含量培养基 (NG, M, HG) 培养;

3) 转染 24h 后, 计数分板 (细胞培养玻片);

4) 高糖刺激 48h 后, 弃去培养玻片中的培养基, 加入 100 μ L 1 \times FLICA (30 \times FLICA 工作液: 1 \times AWB=1:29), 37 $^{\circ}$ C 孵育 90min (20min, 摇动 5min, 20min, 摇动 5min, 20min, 摇动 5min, 20min);

5) 孵育结束, 弃去 FLICA, 加入完全培养基, 37°C 孵育 10 min, 3 次;

6) 弃去上清, 加入 200 μ L 完全培养基含 0.5% Hoechst 33342 以及 PI, 37°C 避光孵育 10min;

7) 弃去上清, 加入新完全培养基, 37°C 孵育 10min, PBS 2 次, 5min ;

8) 加入固定液 200 μ L, 室温固定 20min;

9) 晾干, 不含 DAPI 封片液封片;

10) 使用尼康共聚焦显微成像系统观察细胞, 照相。根据染色情况, 将细胞分为: (1) 活细胞: FAM-YVAD-FMK⁻, PI⁻ 细胞; (2) 早期焦亡细胞: FAM-YVAD-FMK⁺, PI⁻ 细胞; (3) 焦亡细胞: FAM-YVAD-FMK⁺, PI⁺ 细胞。

3.1 流式细胞术检测 HK-2 细胞焦亡

1) 工作液配置: 方法同上;

2) 细胞干预结束后, 用无 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞悬液到灭菌 EP 管中。室温转速 200 g, 离心 10min, 小心弃去上清液; 加入少量 1 \times AWB 重悬细胞, 计数。取 1 \times 10⁶ 细胞到新的 EP 管中, 加入 1 \times AWB 调整体积到 290 μ L; 注意留 3 管对照 (空白组, FLICA 单染组, PI 单染组);

3) 每管加入 10 μ L 30 \times FLICA 充分混匀, 37°C 避光温育 90min, 每 20min 轻轻摇晃 EP 管 (空白组和 PI 单染组细胞不做 FLICA 染色);

4) 温育结束, 加入 1 mL 1 \times AWB 吹打混匀 (注意一定要轻), 37°C 避光温育 10min, 室温 200 g 离心 5min, 小心弃上清液;

5) 1mL 1 \times AWB 重悬细胞, 37°C 恒温箱避光温育 10min, 洗去未结合的 FLICA, 室温 200 g 离心 5min, 弃上清; (FLICA 单染组的细胞可以 4°C 冰箱避光保存 4h);

6) 加入 400 μ L 1 \times AWB 重悬细胞, 加入 5 μ L PI 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育 10min 后置于冰上, 30min 内上机分析。(空白组和 FLICA 单染组的细胞不做 PI 染色);

7) BD Accuri™ C6 Plus 流式细胞仪检测细胞焦亡比率, FLICA 的激发波长和发射波长分别为 492 nm 和 520 nm, PI 的激发波长和发射波长分别为 488-492 nm 和 >610 nm。每个样本分析约 20000 个细胞, 第二象限为焦亡的细胞。

3.2 实验动物

3.2.1 1 型糖尿病小鼠

6-8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠（野生型 WT 和 DDIT4 敲除小鼠 DKO）随机分为四组，WT 对照组（注射枸橼酸盐缓冲液），WT-DKO 组（注射枸橼酸盐缓冲液），STZ-WT 组（腹腔注射 50 mg/kg/day STZ，连续 5 天）和 STZ-DKO 组（腹腔注射 50 mg/kg/day STZ，连续 5 天），每组 6 只。注射完毕一周后检测空腹血糖，血糖 ≥ 16.7 mmol/L 且尿糖阳性（+++~++++）确定 1 型糖尿病小鼠建模成功。实验期间，小鼠自由进食和饮水，并且每周测一次血糖和体重。造模成功后 16 周，称量小鼠体重，处死进行取材。部分肾组织浸于 4% 多聚甲醛固定，经脱水、透明、石蜡包埋肾脏组织，用于 HE、Masson、PAS 检测和免疫组化检测肾组织中目的蛋白表达。部分肾组织置于液氮保存，以用于后续提取 RNA 和蛋白质，Realtime PCR 和 Western 检测。

3.2.2 2 型糖尿病小鼠

8 周龄 C57BL/ks 背景 db/db 小鼠（40~50g）18 只，健康雄性 C57BL/ks 同窝对照 db/m 小鼠（15~20g）6 只，购自南京大学模式动物研究所。所有小鼠恒温（22~25℃）恒湿（53~57%）条件下培养，定时开关灯（12 小时照明，12h 黑暗），定期更换垫料锯末。分组情况 db/m 组：不处理；db/db 小鼠随机分为 db/db 组：不处理；db/db-control 组：右侧肾盂原位注射 HBAAV2/9-*luc* NC 对照；shDDIT4 组：右侧肾盂原位注射 HBAAV2/9-m-shDDIT4-*luc*（shDDIT4 序列：TTCTCCGAACGTGTCACGTAA）。操作前用 10% 水合氯醛（0.1-0.2mg/20mg）对实验动物进行麻醉，俯卧位放置，背部脊柱右侧 1cm、肋下缘 2cm 处开刀，逐层分离脂肪组织、筋膜后暴露肾脏，规格为 30G 的无菌注射针肾盂内多点注射，手术完成消毒缝合。所有 db/db 小鼠术中切除左侧肾脏，去除左肾代偿作用。实验期间，小鼠可自由进食进水，2 周监测一次血糖和体重。16 周禁食 12 小时后，称量体重，处死进行取材。部分肾组织浸于 4% 多聚甲醛固定，经脱水、透明、石蜡包埋肾脏组织，用于免疫组化检测肾组织中 DDIT4 和 NLRP3 蛋白表达。部分肾组织置于液氮保存，以用于后续提取总蛋白质，Western 检测。本研究经河北医科大学伦理委员会批准。

3.3 免疫组织化学检测

对包埋好的肾脏组织连续切片（厚度 4 μm ），使用黏附切片（多聚赖氨酸防脱处理），免疫组织化学通用二步法检测进行如下操作：

- 1) 烤片：65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烤片 6h，使切片紧贴在载玻片上，收入标本盒，待用。脱蜡前，同样条件烘烤 2h，冷却至室温后进行脱蜡；
- 2) 脱蜡：切片依次置入三个二甲苯缸中脱蜡：
二甲苯 I 缸 8min
二甲苯 II 缸 8min
二甲苯 III 缸 8min
- 3) 水化：脱蜡结束后，切片置入梯度酒精中各 8min，无水乙醇 \rightarrow 95%乙醇 \rightarrow 85%乙醇 \rightarrow 75%乙醇；
- 4) PBS 清洗切片 3 次，每次 5min；
- 5) 抗原修复：将切片浸入装有 0.1 mol/L 柠檬酸抗原修复液的容器中，容器置入煮开的水中，水浴 1h，静置自然冷却到室温。
- 6) PBS 清洗切片 3 次，每次 5min；
- 7) 封闭：用免疫组化笔圈定待测的组织区域，滴加适量的内源性过氧化物酶常温封闭 30min，PBS 清洗切片 3 次，每次 5min；
- 8) 一抗：滴加一抗（一抗稀释液稀释抗体，DDIT4 1: 200；NLRP3 1: 200），充分覆盖待测组织区，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；
- 9) 第二天，孵育的切片放置室温，PBS 清洗切片 3 次，每次 5min；
- 10) 滴加增强反应液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min，PBS 清洗 3 次，每次 5min；
- 11) 二抗：擦干组织周围的 PBS，滴加辣根酶标记山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物，37 $^{\circ}\text{C}$ 1h，PBS 清洗切片 3 次，每次 5min；
- 12) 显色：DAB 底物缓冲液 A 液和 DAB 浓缩显色液 B 液适当比例配制 DAB 显色液，滴加到切片的待测组织区，光镜下实时观察显色程度，切片浸入自来水终止显色，所有切片尽量控制显色时间一致。注意：DAB 显色液需避光且现配现用；
- 13) 复染：切片置于苏木素染色液中复染 2min，自来水冲洗；
- 14) 分化：切片置于 1%盐酸酒精中分化 10s，自来水冲洗；
- 15) 返蓝：分化后组织切片浸入 1%氨水中返蓝 5s，自来水冲洗；
- 16) 脱水：返蓝后，组织切片依次浸入梯度酒精溶液（由低浓度向高浓度）中脱水：75%乙醇 3min \rightarrow 85%乙醇 3min \rightarrow 100%乙醇 3min；

17) 晾干, 封片: 吹风机吹干切片, 滴加中性树脂胶于载玻片组织上, 盖玻片封片, 晾干后镜检读片。

18) Image J 软件进行批处理, 计算平均光密度值, 分析结果。

3.4 Western Blot

3.4.1 蛋白质提取

一次性手术刀片切取绿豆大小液氮冻存的肾脏组织放于装有 1 mL RIPA 裂解液的 EP 中, 置于冰上。RIPA 裂解液在使用前数分钟内加入 PMSF、DTT 等蛋白酶抑制剂, 使其最终浓度为 1 mM。匀浆机冰上匀浆, 静置 30min, 4°C、12000 r/min 离心 20min, 取上清液, 进一步测定蛋白浓度。

3.4.2 蛋白质定量

利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度, 进行蛋白定量, 具体实验操作如下:

1) 工作液的配制: 按照 BCA 试剂: Cu 试剂=50:1 的比例配制成 BCA 工作液, 充分混匀, 尽量现配现用;

2) 标准品的稀释: 取 10 μ L 5 mg/mL BSA 标准品用, 加入 90 μ L 的 PBS, 稀释成终浓度为 0.5mg/mL 标准品。将 0.5mg/mL 标准品按 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 μ L 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中, PBS 补足至 20 μ L, 移液器温和地混匀液体, 注意避免气泡的产生;

3) 样品的稀释: 1 μ L 样品和 19 μ L PBS 缓冲液充分混匀, 加入到 96 孔板的样品孔中;

4) 酶标仪读数: 标准品孔和样品孔中加入 200 μ L 配好的 BCA 工作液, 37°C 孵育 20min。酶标仪测定波长为 A562 nm 的吸光度值, 记录数据;

5) 根据标准品的吸光度值, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出对应的蛋白浓度, 再乘以稀释倍数, 得到样本蛋白质浓度;

6) 按照样品中的最小浓度进行调平, 将所有样品蛋白质浓度调成一致, 加入等量体积的 2 \times loading buffer, 100°C 金属浴 10min 变性, -80°C 冰箱保存待用。

3.4.3 SDS-PAGE

1) SDS-PAGE 凝胶配制: 清洗玻璃板 (厚度 1.5 cm), 吹风机吹干玻

璃板表面的水分，尽量确保玻璃板表面没有水渍和灰尘。按照配方说明开始配胶，先配分离胶，灌入组装好的玻璃板中，用异丙醇封闭压平界面。室温静置 30min，待分离胶凝固。倒掉异丙醇，用滤纸洗干净，开始灌入浓缩胶，插入齿梳，室温静置 30min，拔掉齿梳；

2) 电泳：组装电泳装置，凝胶玻璃板长板在外，短板在内，对齐底边，固定加紧，加入电泳缓冲液。上样，每孔加入 20 μg 变性好的蛋白样品。凝胶版的第一个孔和最后一个孔分别加入 5 μL 和 1 μL 的预染 marker (loading buffer 补齐)。连通电极，电流调至最大，恒压 90 V 开始电泳，约 30min 后，样品浸入分离胶，将电压调至 120 V，继续电泳，直至溴酚蓝指示剂进入分离胶底端，终止电泳；

3) 转印：电泳结束，提前剪裁好滤纸、PVDF 膜，将滤纸和海绵一同浸入遇冷的转膜液。PVDF 膜用甲醇激活 1min，然后放入转膜液中备用。打开转印夹，负极在下，自下而上放入海绵→双层滤纸→凝胶→PVDF 膜→双层滤纸→海绵，每放一层，加点转膜液排除气泡。组装好后转印夹放入转印槽中，300 mA 恒流 2h；

4) 封闭：转膜结束，TBST 清洗 5min。TBST 配制的 3%脱脂奶粉 (M/V) 室温封闭 1 h；

5) 一抗孵育：加入一抗 (DDIT4 1: 200)，4°C 孵育过夜。

6) 二抗孵育：第二天，拿出复温 30min。回收一抗，TBST 清洗 3 次，每次 10min；加入二抗 (兔二抗 1: 10000)，室温摇床孵育 2h。

7) 显色：二抗孵育结束，TBST 清洗 3 次，10min/次。PVDF 膜用 TBST 浸泡，保持膜的湿润性。ECL 化学发光液 A 液和 B 液，避光混合，凝胶电泳成像仪显影扫描，后期使用 Image J 软件进行条带分析。

3.5 Masson 染色

本实验按照改良版 Masson 三色染色试剂盒步骤进行，具体如下：

- 1) 烤片脱蜡相关步骤和 IHC 染色相同；
- 2) 组织切片浸入试剂 A 媒染液，室温过夜；
- 3) 第二天，自来水清洗 10min；
- 4) Masson 试剂 B 天青石蓝染色液滴加到待测组织区染色 3min，自来水清洗 2 次，每次 20s；
- 5) Masson 试剂 C Mayer 苏木素染色液滴加到待测组织区染色 3min，

蒸馏水清洗 2 次，每次 20s；

6) Masson 试剂 D 酸性分化液分化，自来水终止分化，蒸馏水浸泡 10 min；

7) Masson 试剂 E 丽春红品红染色液滴加到切片上，染色 10min，蒸馏水清洗 2 次，每次 20s；

8) Masson 试剂 F 磷钼酸溶液滴加到待测组织区，孵育 8min；

9) 甩去磷钼酸溶液，不用水洗，直接滴加 Masson 试剂 G 苯胺蓝染色液染色 5min；

10) Masson 试剂 H 弱酸溶液洗掉苯胺蓝染色液，切片组织区再次滴加弱酸溶液处理 2min；

11) 脱水透明：依次 95%乙醇 30s→无水乙醇 I 30s→无水乙醇 II 1min→二甲苯 I 缸 2min→二甲苯 II 缸 2min。晾干，滴加中性树胶进行封片。在显微镜下观察肾组织胶原纤维的变化。

3.6 PAS 染色

本实验按照 PAS 操作说明书进行，具体如下：

1) 烤片脱蜡相关步骤和 IHC 染色相同；

2) 自来水清洗 3min，蒸馏水浸泡 2 次，每次 20s；

3) 将组织切片浸入试剂 A 氧化剂中，室温孵育 8min；

4) 自来水清洗 1 次，蒸馏水浸泡 2 次，每次 20s；

5) 将组织切片置入试剂 B Schiff 染色液中，避光室温孵育 20min；

6) 自来水清洗 10min；

7) 将组织切片浸入试剂 C 苏木素染色液中，染核 3min，水洗；

8) 试剂 D 酸性分化液分化 5s，水洗，氨水返蓝，水洗。

9) 脱水透明：依次 95%乙醇 30 s→无水乙醇 I 30s→无水乙醇 II 1min→二甲苯 I 缸 2min→二甲苯 II 缸 2min。晾干，滴加中性树胶进行封片。在显微镜下观察肾组织糖原的变化。

3.7 统计分析

实验数据使用 GraphPad prism 9 软件进行统计分析。双尾未配对 t 检验用于确定两组之间的差异分析。单向方差分析(one-way ANOVA)检验至少 3 组之间的差异， $P<0.05$ 具有统计学意义。

1. DDIT4 在高糖诱导下 HK-2 细胞中的表达情况

为了研究 DDIT4 在高糖环境下肾小管上皮细胞中的表达，以人肾小管上皮 HK-2 为研究对象，HG (30 mmol/L 葡萄糖) 诱导 HK-2 细胞 6h, 12h, 24h, 48h, 72h 不同时间点，检测 DDIT4 的表达变化，Realtime PCR 和 Western Blot 结果显示，与对照组 (0h) 相比，从高糖诱导 12h 开始，DDIT4 mRNA 和蛋白质开始显著增加，随着高糖诱导时间的延长，DDIT4 mRNA 和蛋白质表达量逐渐增加，48h 达到高峰 (Fig.1-1, Fig.1-2)。

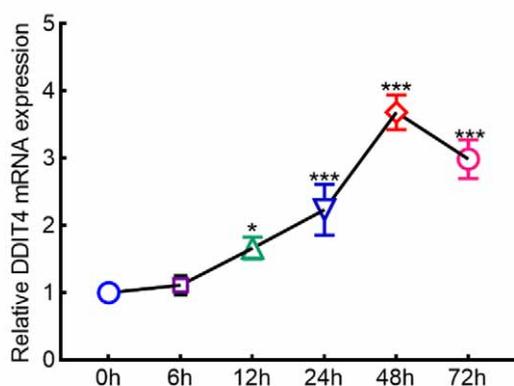


图 1-1 Realtime PCR 检测高糖诱导下不同时间点 HK-2 细胞中 DDIT4 mRNA 的表达情况

Fig.1-1 The expression of DDIT4 mRNA in HK-2 cells at different time points under high glucose stimulation detected by Realtime PCR

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, vs 0h

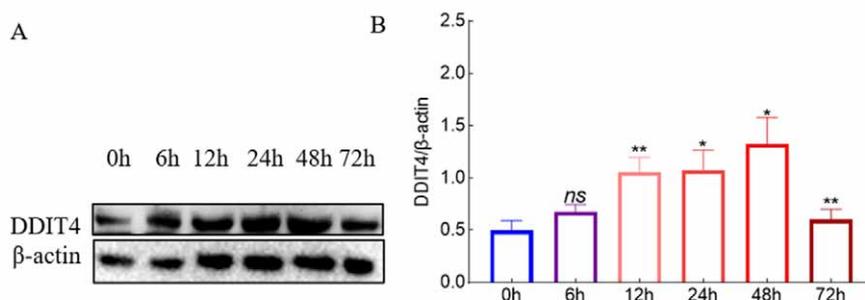


图 1-2 Western Blot 检测高糖刺激下不同时间点 HK-2 细胞中 DDIT4 的蛋白表达情况

Fig.1-2 The expression of DDIT4 protein in HK-2 cells at different time points

under high glucose stimulation detected by Western Blot

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 0h

2.高糖诱导对肾小管上皮细胞 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路的影响

为研究细胞焦亡在高糖环境下肾小管上皮细胞中的作用，分别以 NG（5.5 mmol/L 葡萄糖）、M（5.5 mmol/L 葡萄糖+24.5 mmol/L 甘露醇）和 HG（30 mmol/L 葡萄糖）为干预条件培养 HK-2 细胞，其中高糖分不同时间点（6h, 12h, 24h, 48h）诱导，以便了解不同浓度葡萄糖以及不同时间点对 HK-2 细胞炎症信号通路活化水平的影响。Western Blot 检测结果显示高糖诱导上调肾小管上皮细胞 NLRP3 表达水平，促进 Caspase-1 和 GSDMD 的剪切活化。而 NG 组与 M 组相比表达水平差异无显著意义，且显著低于 HG 组。提示葡萄糖，而不是渗透压改变，是活化 HK-2 细胞中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路的主要诱因，而且高糖诱导 48h NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号到达高峰，接下来实验选择时间点为高糖刺激 48h（Fig.1-3）。

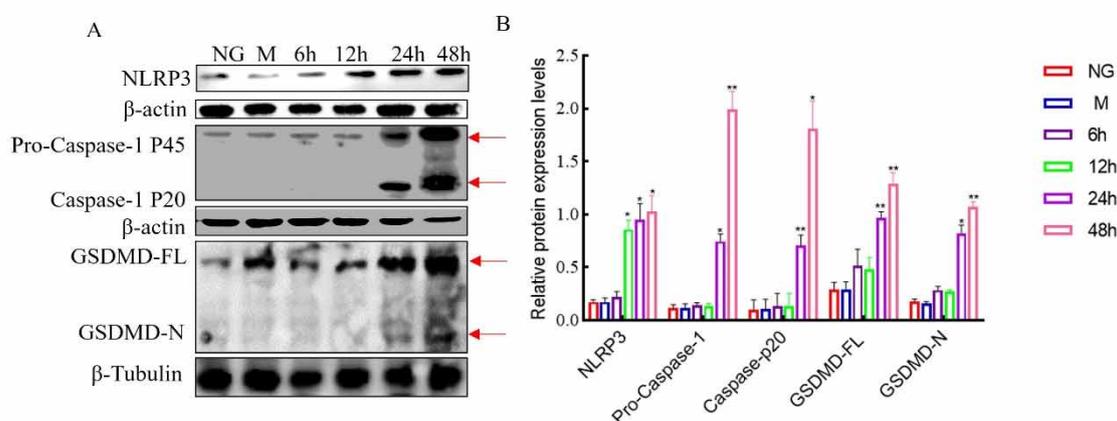


图 1-3 高糖诱导 HK-2 细胞不同时间点 NLRP3/caspase-1/GSDMD 蛋白表达情况

Fig.1-3 The expression of NLRP3/caspase-1/GSDMD protein in HK-2 cells at different time points under high glucose stimulation detected by Western Blot

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs NG

3. 高糖诱导对肾小管上皮细胞焦亡和纤维化反应的作用

(1) AO/EB 染色检测细胞膜完整性: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, NG 组和 M 组几乎没有橘红色荧光染色, HG 诱导 48h 后 HK-2 细胞橘红色荧光染色增强(细胞膜完整的细胞, AO 可穿透并嵌入核 DNA, 显出绿色荧光; 而 EB 仅能透过细胞膜受损的细胞, 嵌入核 DNA, 发橘红色荧光)。结果提示: 高糖诱导干预下, 肾小管上皮细胞膜完整性受损 (Fig.1-4)。

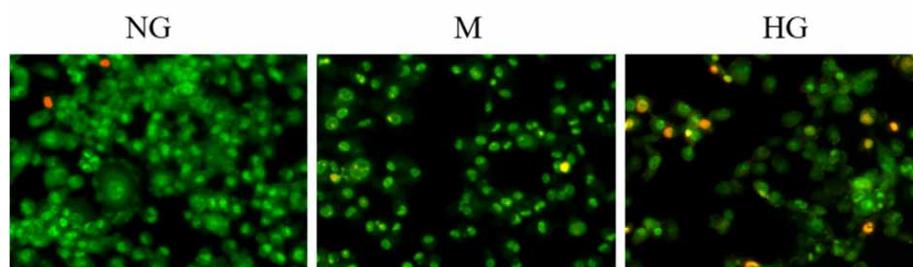


图 1-4 AO/EB 染色检法检测各组 HK-2 细胞的细胞膜完整性 (×200)

Fig.1-4 The cell membrane integrity of HK-2 cells in each group detected by AO/EB staining assay (×200)

(2) 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 与 NG 组相比, 高糖诱导下的 HK-2 细胞释放的 LDH 明显增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示: 高糖诱导肾小管细胞后, 细胞膜发生破裂 (Fig.1-5)。

(3) CCK-8 细胞活力检测: 与 NG 相比, 高糖诱导的 HK-2 细胞活力明显减弱, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示: 高糖诱导肾小管细胞后, 细胞活力减弱 (Fig.1-5)。

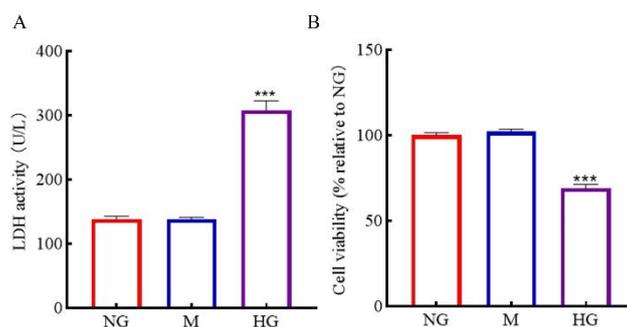


图 1-5 各组 HK-2 细胞的乳酸脱氢酶活性和细胞活力

Fig.1-5 The LDH activity and cell viability of HK-2 cells in each group

*** $P < 0.001$, vs NG

(4) EDU 细胞增殖活性检测: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 与 NG 组比较, 高糖诱导的 HK-2 细胞 EDU 染色比例降低, 差异具有统计学意义 ($p<0.001$), 表明高糖诱导的 HK-2 细胞增殖活性减弱 (Fig.1-6)。

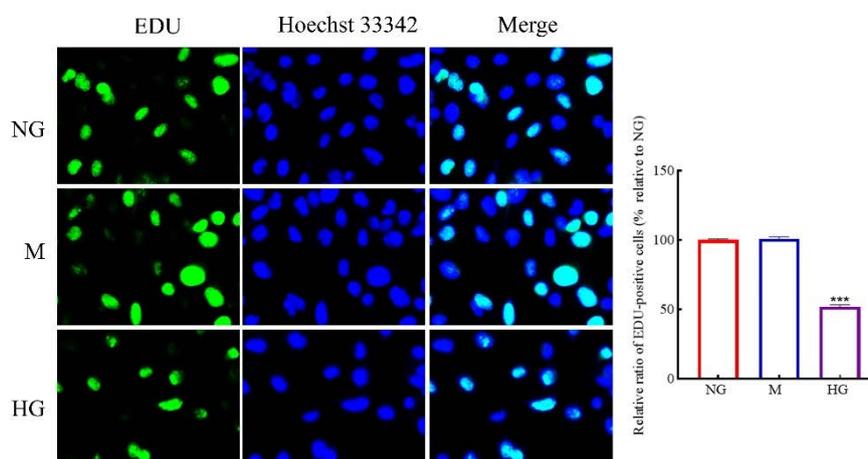


图 1-6 EDU 检测各组 HK-2 细胞增殖活性 ($\times 200$)

Fig.1-6 The cell proliferation activity of HK-2 in each group detected by EDU analysis ($\times 200$), *** $P<0.001$, vs NG

(5) 免疫荧光共聚焦分析 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, FAM-YVAD-FMK (绿色, 活性 Caspase-1 探针)、PI (红色, 标记死细胞) 和 Hoechst 33342 (蓝色, 标记细胞核) 对细胞进行染色分析结果显示, 与 NG 组相比, HG 组 FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性的细胞染色增多, HG 组发生焦亡的 HK-2 细胞 (FAM-YVAD-FMK⁺/PI⁺细胞) 增加了 1.07 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$) (Fig.1-7)。

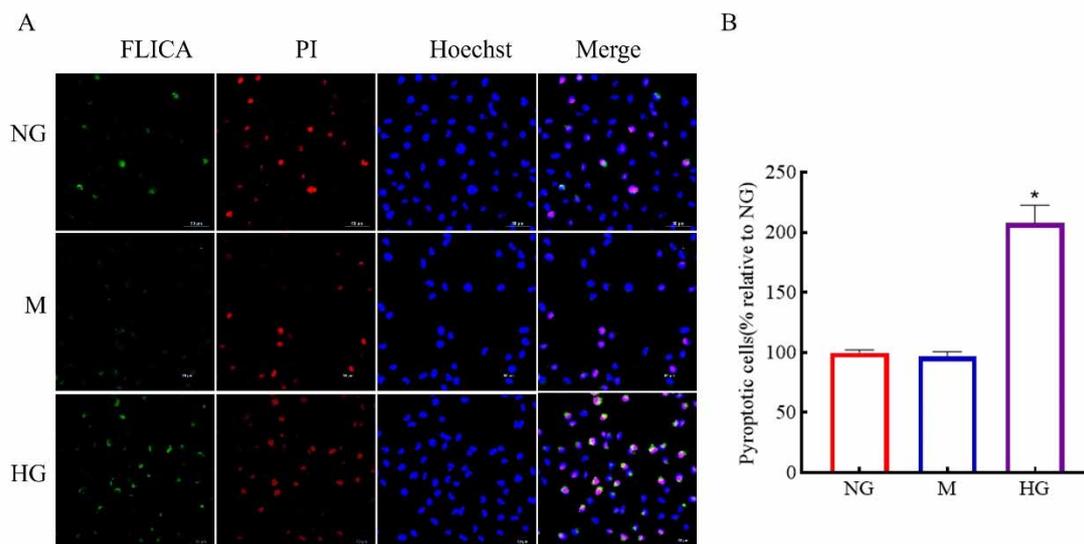


图 1-7 高糖刺激 HK-2 细胞后免疫荧光共聚焦检测细胞焦亡 ($\times 200$)

Fig.1-7 Detection of cell pyroptosis in HK-2 cells stimulated by high glucose using Immunofluorescence confocal ($\times 200$), * $P < 0.05$, vs NG

(6) 流式细胞术检测细胞焦亡: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 采用流式细胞术定量分析各组细胞发生焦亡比例。结果显示, 与 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染结果一致, 相比 NG 组, 高糖诱导 48h 的 HK-2 细胞发生焦亡更为明显 (Fig.1-8)。

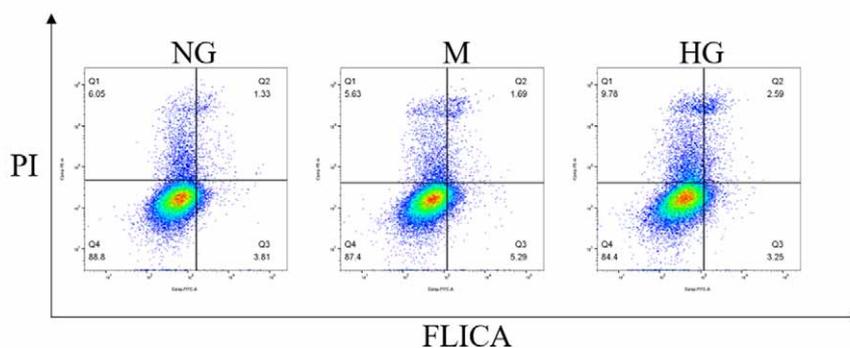


图 1-8 流式细胞术检测高糖诱导 HK-2 细胞后细胞焦亡情况

Fig.1-8 Detection of cell pyroptosis in HK-2 cells stimulated by high glucose using flow cytometry

(7) Western blot 检测 HK-2 细胞中 DDIT4 和焦亡相关指标的蛋白表达: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 与 NG 组相比, HG 组

HK-2 细胞，DDIT4, NLRP3, Pro-caspase-1, Caspase-1 P20, GSDMD-FL(GSDMD 全长), GSDMD-N(GSDMD 活性片段), ASC, IL-1 β (mature), IL-18 表达显著增加，差异具有统计学意义 (Fig.1-9)。

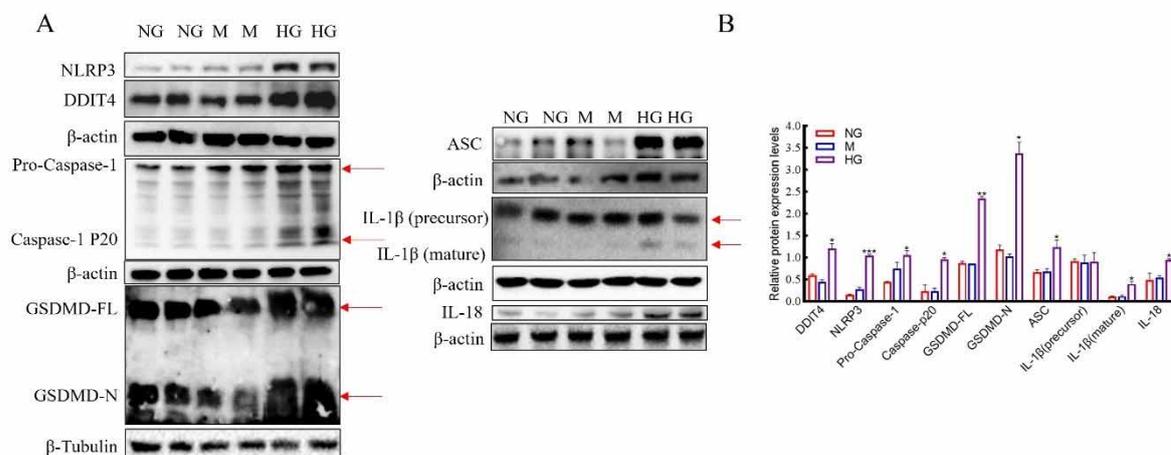


图1-9 Western Blot 检测高糖诱导后细胞焦亡相关指标蛋白的表达

Fig.1-9 The pyroptosis related indicator proteins expression with high glucose stimulation detected by western blot, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, vs NG

(8)免疫荧光检测 HK-2 细胞中 DDIT4 和焦亡相关指标的蛋白表达: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 免疫荧光结果与 Western blot 结果一致, 与 NG 组相比, HG 组 HK-2 细胞, DDIT4, NLRP3, Caspase-1, GSDMD 荧光染色明显增强, 荧光强度结果分析差异具有统计学意义 (Fig.1-10)。

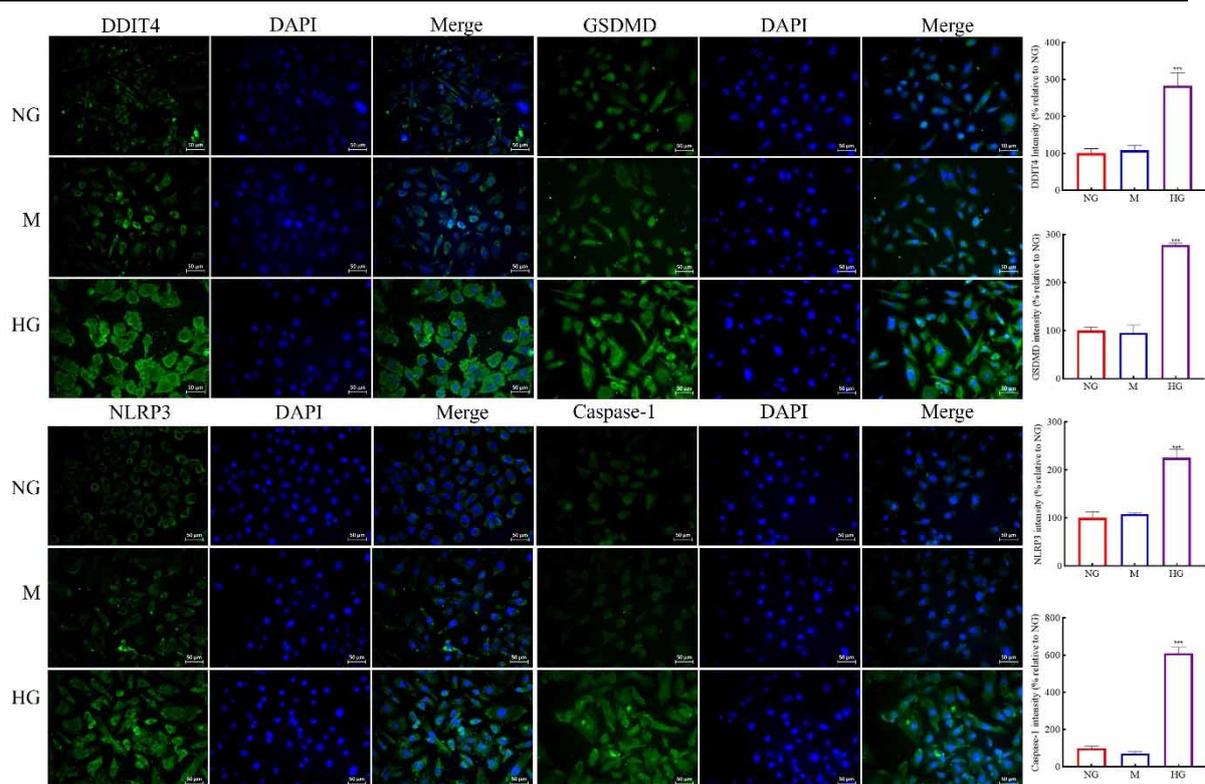


图 1-10 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 DDIT4、GSDMD、NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达情况 (×200)

Fig.1-10 The protein expression of DDIT4, GSDMD, NLRP3 and Caspase-1 in HK-2 cells in each group detected by Immunofluorescence (×200),
*** $P < 0.001$, vs NG

(9) Western blot 检测 HK-2 细胞中纤维化指标的变化: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 与 NG 组相比, 高糖干预后, Collagen Type I 和 FN1 蛋白表达增加, 灰度值统计结果差异具有统计学意义(Fig.1-11)。

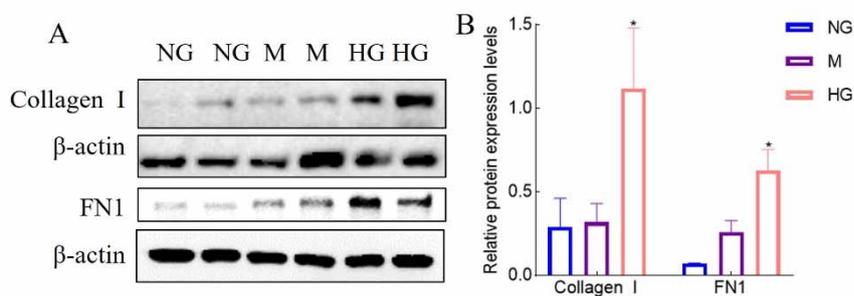


图 1-11 Western blot 检测各组 HK-2 细胞纤维化指标的表达
Fig.1-11 The fibrosis index expression in HK-2 cells in each group detected by Western blot, * $P < 0.05$, vs NG

(10) 免疫荧光检测 HK-2 细胞中纤维化指标的变化: NG、M、HG 不同条件下干预 HK-2 细胞 48h, 免疫荧光结果与 Western blot 结果一致, 高糖刺激 HK-2 细胞后, 纤维化指标 Collagen I 和 FN1 染色显著增强, 荧光强度统计结果差异具有统计学意义 (Fig.1-12)。

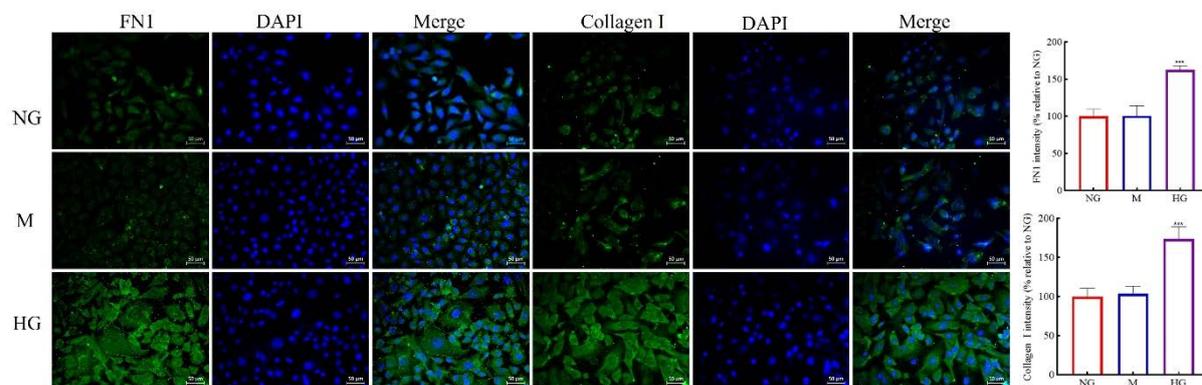


图 1-12 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 FN1 和 Collagen I 的表达情况 (×200)

Fig.1-12 The protein expression of FN1 and Collagen I in HK-2 cells of each group detected by Immunofluorescence (×200), *** $P<0.001$, vs NG

4. 敲低 DDIT4 对 HK-2 细胞焦亡和纤维化指标的影响

(1) 敲低效率的验证: Realtime PCR、Western Blot、免疫荧光结果显示, 与 NG 组相比, HG 组的 DDIT4 mRNA 和蛋白质表达均升高, 转染 shDDIT4 质粒后, 细胞中 DDIT4 mRNA 和蛋白都表达减少 (Fig.1-13; Fig.1-14)。

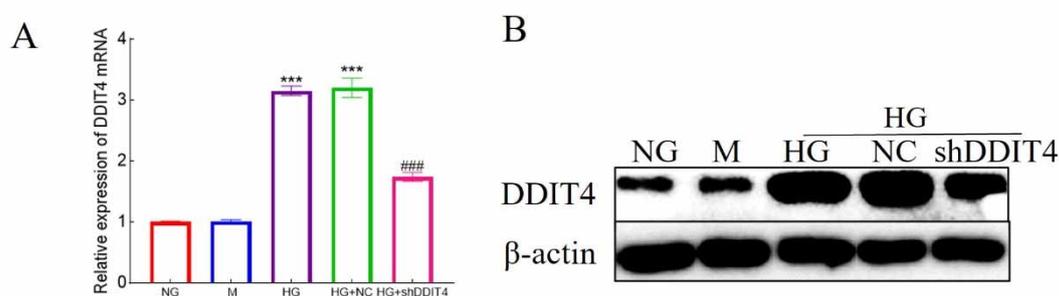


图 1-13 Realtime PCR 和 Western Blot 验证 DDIT4 的敲低效率

Fig.1-13 The validation of knockdown efficiency of DDIT4 using Realtime PCR and Western Blot, ***/### $P<0.001$, * vs NG, # vs HG

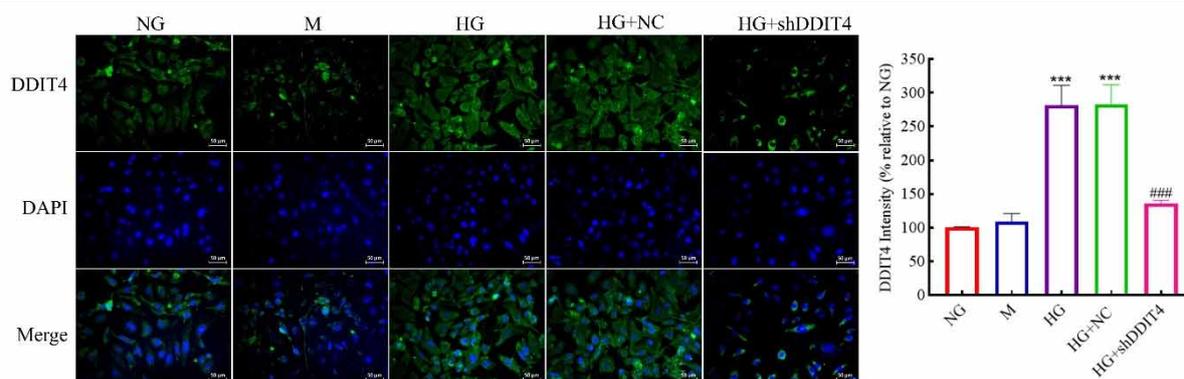


图 1-14 免疫荧光验证 DDIT4 的敲低效率 ($\times 200$)

Fig.1-14 The validation of knockdown efficiency of DDIT4 using Immunofluorescence ($\times 200$), $^{***}/### P < 0.001$, * vs NG, $^{\#}$ vs HG

(2) 敲低 DDIT4 后, 细胞焦亡执行蛋白 GSDMD 的变化: 收集各组 HK-2 细胞, 提取细胞总蛋白, Western Blot 检测 GSDMD 的变化, 结果显示, shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞 GSDMD-FL 和 GSDMD-N 的表达, 灰度值统计差异具有统计学意义 (Fig.1-15)。

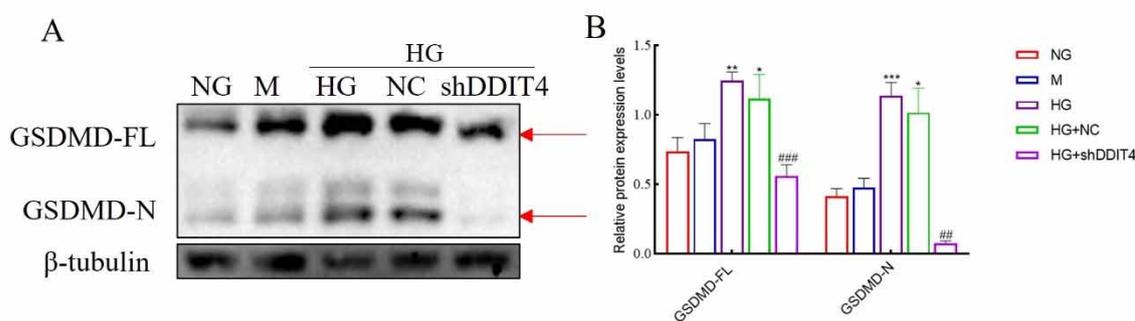


图 1-15 敲低 DDIT4 后 Western Blot 检测 GSDMD 的变化

Fig.1-15 The Changes of GSDMD after knocking down DDIT4 detected by Western Blot, $^{*}/^{\#} P < 0.05$; $^{###} P < 0.01$, $^{***} P < 0.001$; * vs NG, $^{\#}$ vs HG

(3) 敲低 DDIT4 后, 免疫荧光检测细胞焦亡执行蛋白 GSDMD 的变化: 与 Western Blot 结果一致, 和 HG 组细胞相比, 敲低组 HK-2 细胞 GSDMD 染色减弱, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (Fig.1-16)。

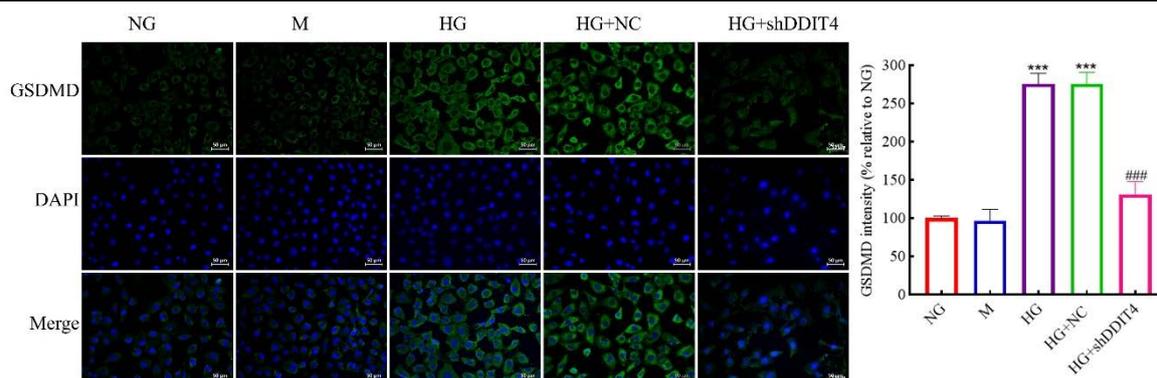


图 1-16 敲低 DDIT4 后免疫荧光检测 GSDMD 变化 ($\times 200$)

Fig.1-16 The Changes of GSDMD after knocking down DDIT4 detected by Immunofluorescence ($\times 200$), $^{***}/\#\#\#P<0.001$; * vs NG, $^{\#}$ vs HG

(4) 敲低 DDIT4 后, AO/EB 染色检测细胞膜完整性变化: 与 HG 组细胞相比, 敲低组 HK-2 细胞的橘红色荧光染色显著减少。结果提示: shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞膜完整性的受损 (Fig.1-17)。

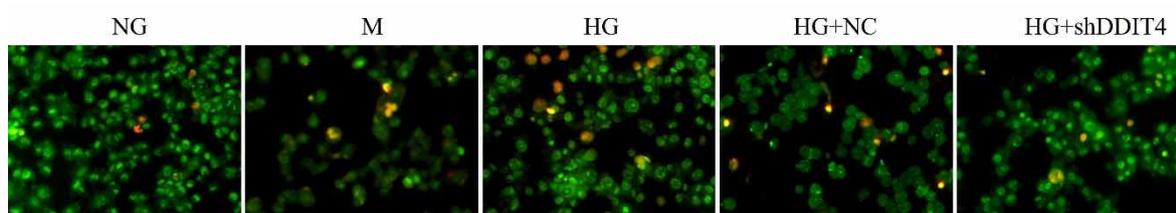


图 1-17 AO/EB 染色检法检测敲低 DDIT4 后 HK-2 细胞膜完整性 ($\times 200$)

Fig.1-17 The cell membrane integrity of HK-2 cells after knocking down DDIT4 detected by AO/EB staining assay($\times 200$)

(5) 敲低 DDIT4 后, LDH 活性检测: 与 HG 组细胞相比, 敲低组 HK-2 细胞释放的 LDH 明显减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。提示: shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞膜破裂 (Fig.1-18)。

(6) 敲低 DDIT4 后, CCK-8 细胞活力检测: 与 HG 组细胞相比, 敲低组 HK-2 细胞的细胞活力明显增强, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。提示: shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞活力的降低 (Fig.1-18)。

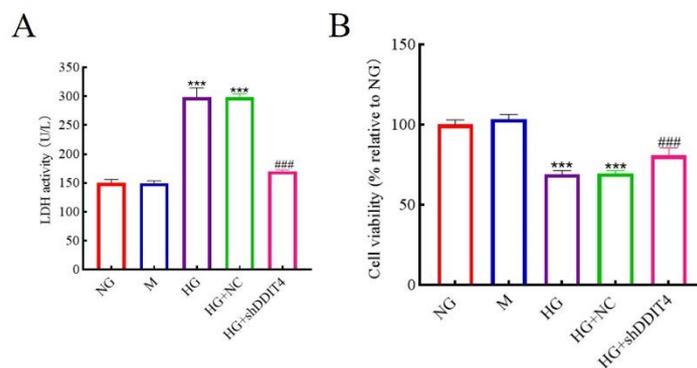


图 1-18 敲低 DDIT4 后 HK-2 细胞的乳酸脱氢酶活性和细胞活力变化
 Fig.1-18 The changes of LDH activity and cell viability in HK-2 cells after knocking down DDIT4, ***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(7) 敲低 DDIT4 后, EDU 细胞增殖活性检测: 与 HG 组细胞相比, 敲低组 HK-2 细胞的 EDU 染色比例明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示: shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞增殖活性的降低 (Fig.1-19)。

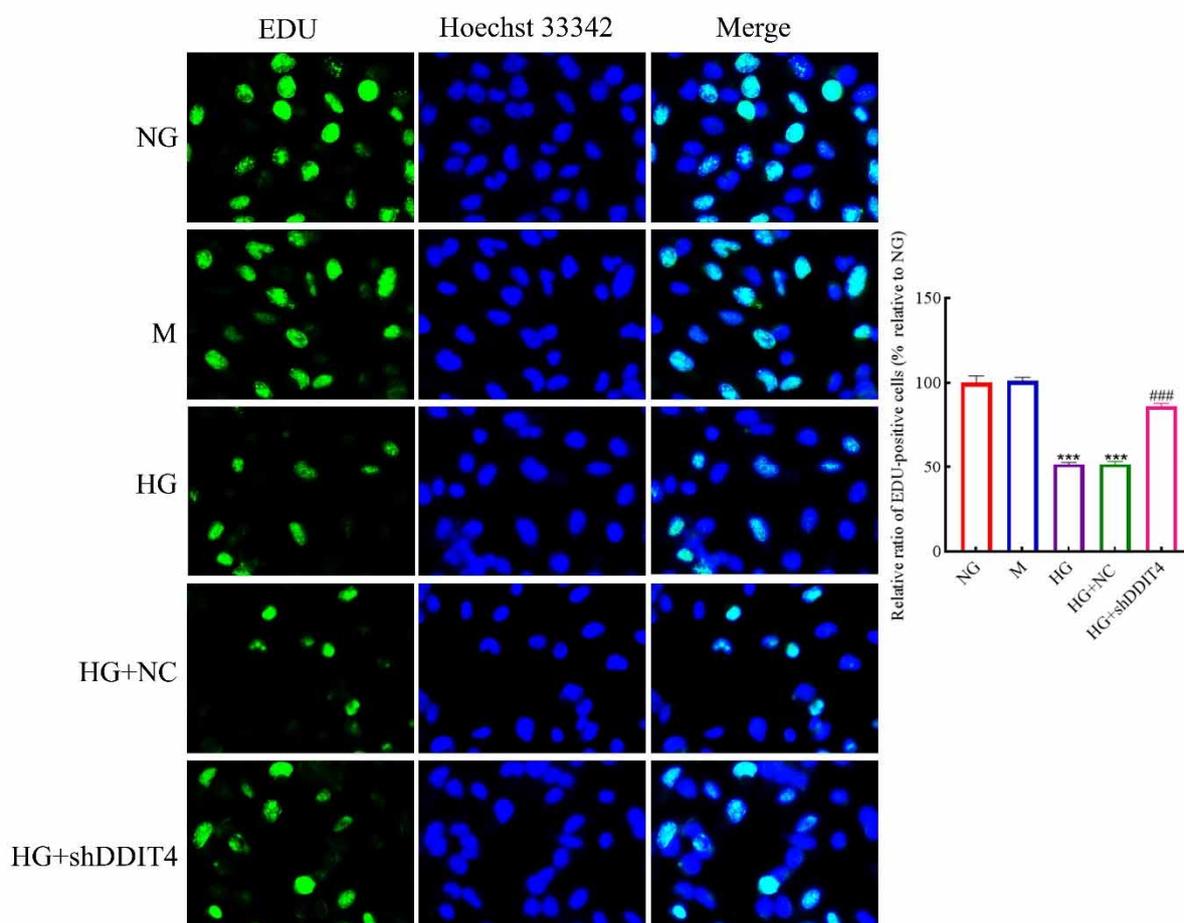


图 1-19 EDU 检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞的增殖活性 (×200)

Fig.1-19 The cell proliferation viability of HK-2 cells after knocking down DDIT4 detected by EDU (×200), ^{***/###} $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(8) 敲低 DDIT4 后免疫荧光共聚焦分析 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染:与 HG 组细胞相比, 敲低组 FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性的细胞显著减少, 统计结果显示与 HG 组相比, 敲低组发生焦亡的 HK-2 细胞(FAM-YVAD-FMK⁺/PI⁺细胞)明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.001$) (Fig.1-20)。

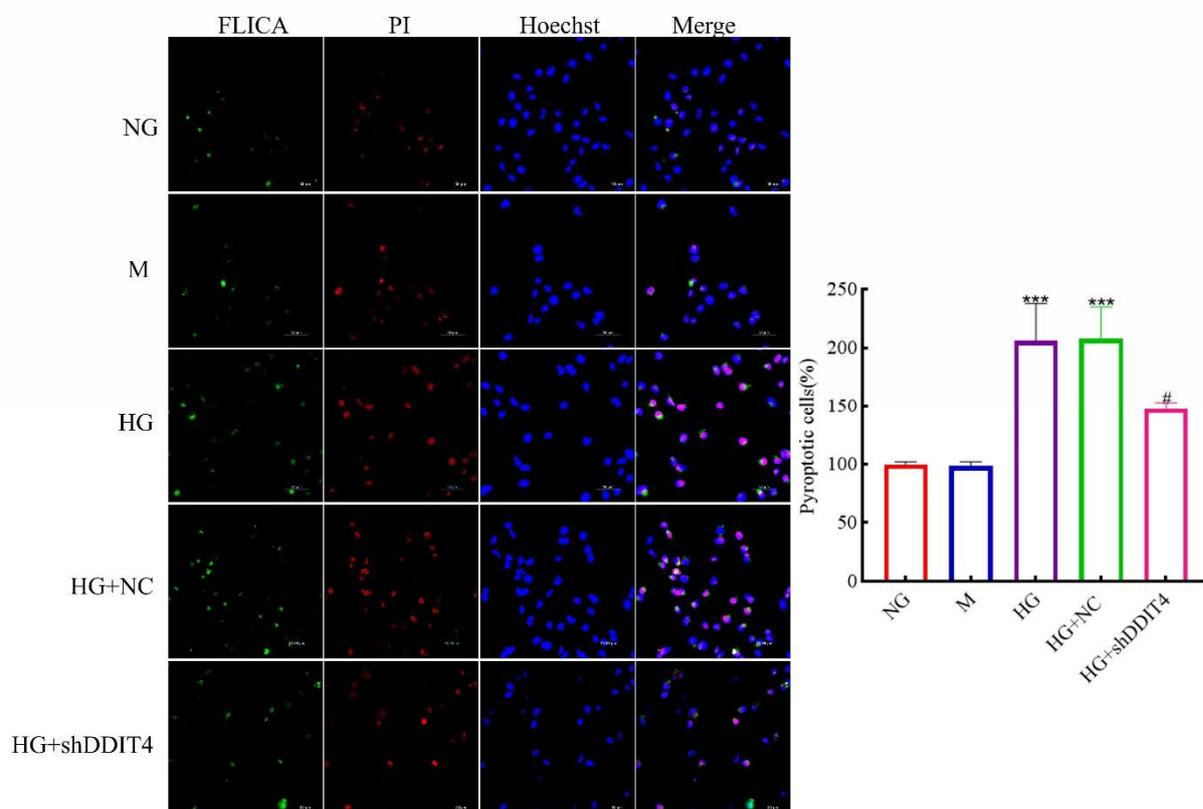


图 1-20 免疫荧光共聚焦检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞焦亡情况 (×200)

Fig.1-20 The cell pyroptosis in HK-2 cells after knocking down detected by Immunofluorescence confocal (×200), ^{***} $P < 0.001$, vs NG; # $P < 0.05$, vs HG

(9) 敲低 DDIT4 后流式细胞术检测细胞焦亡: 与 HG 组相比, 敲低组 HK-2 细胞发生焦亡比例降低。结果显示, 与 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染结果一致, 相比 HG 组, shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-

2 细胞焦亡 (Fig.1-21)。

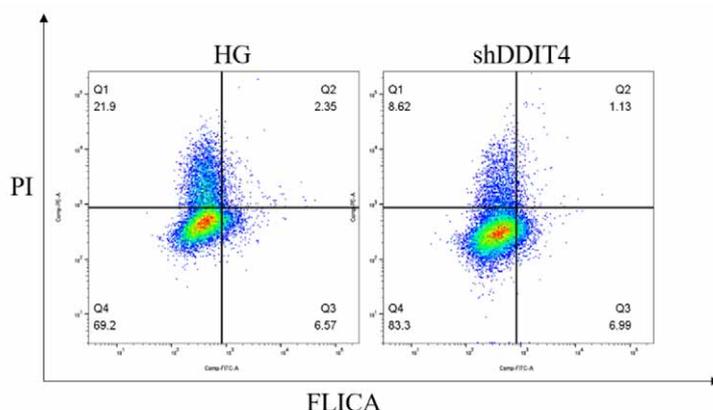


图 1-21 流式细胞术检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞焦亡情况

Fig.1-21 The cell pyroptosis in HK-2 cells after knocking down DDIT4 detected by flow cytometry

以上均提示: 敲低 DDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞焦亡。

(10) 敲低 DDIT4 后 Western blot 检测 HK-2 细胞中纤维化指标的变化: 与 HG 组相比, 敲低 DDIT4 后, Collagen I 和 FN1 蛋白表达减少, 灰度值结果统计差异具有统计学意义 (Fig.1-22)。

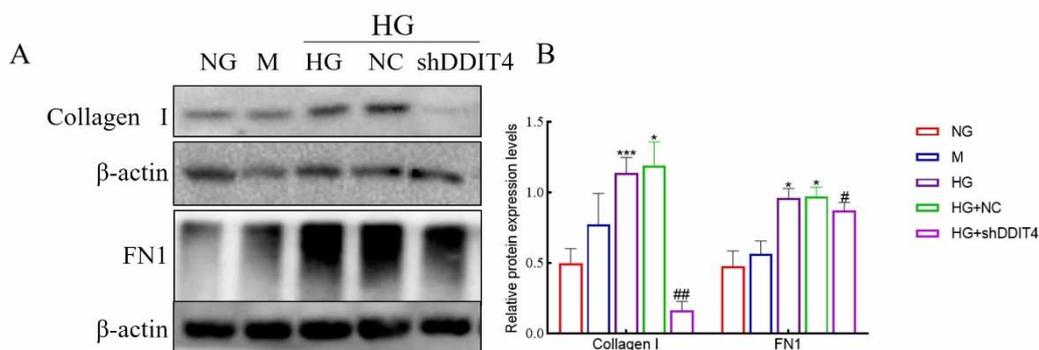


图 1-22 Western blot 检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞纤维化指标的表达

Fig.1-22 The fibrosis index expression in HK-2 cells after knocking down DDIT4 detected by Western, $^{*}/\#P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; * vs NG, $^{\#}$ vs HG

(11) 免疫荧光检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞中纤维化指标的变化: 免疫荧光结果与 Western blot 结果一致, 与 HG 组细胞相比, 敲低组细胞纤维化指标 Collagen I 和 FN1 的染色显著减弱, 荧光强度统计结果差异具

有统计学意义 (Fig.1-23)。

以上均提示：提示：shDDIT4 能够明显抑制高糖诱导的 HK-2 细胞的纤维化相关蛋白的生成。

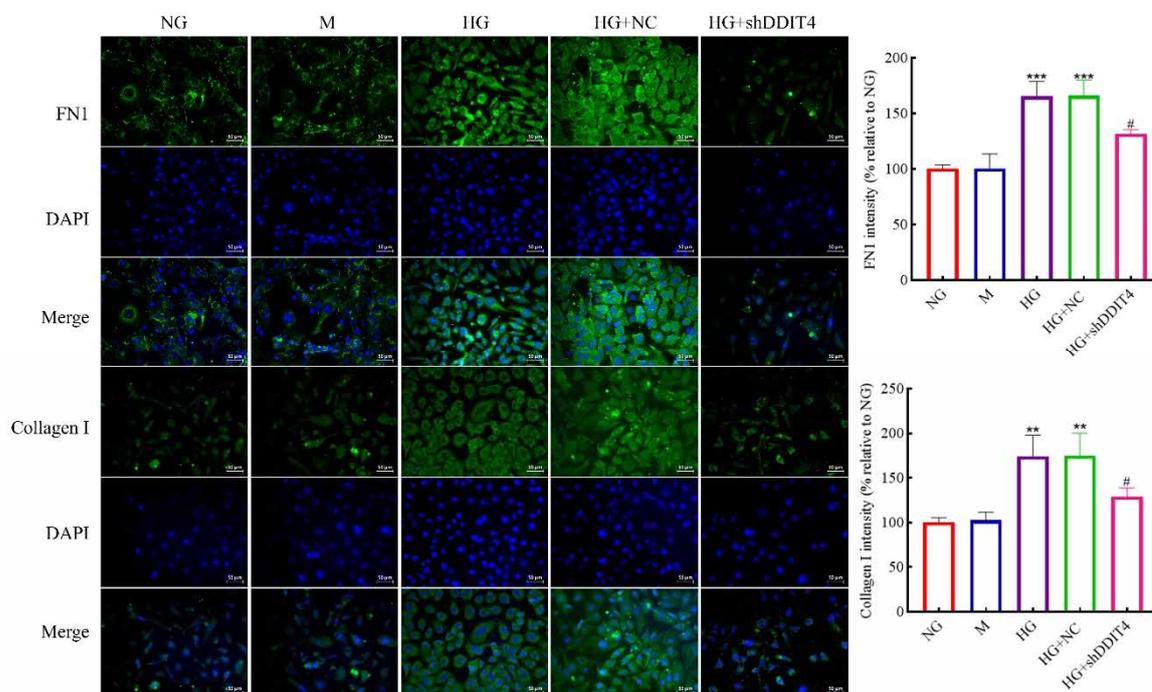


图 1-23 免疫荧光检测 DDIT4 敲低后 HK-2 细胞中 FN1 和 Collagen I 的表达情况 (×200)

Fig.1-23 The protein expression of FN1 and Collagen I in HK-2 cells after knocking down detected by Immunofluorescence (×200)

$P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; *vs NG, #vs HG

5.过表达 DDIT4 对 HK-2 细胞焦亡和纤维化指标的影响

(1) 过表达效率的验证：Realtime PCR、Western Blot、免疫荧光结果显示，与 NG 组相比，HG 组的 DDIT4 mRNA 和蛋白质表达均升高，转染 DDIT4 质粒后，细胞中 DDIT4 mRNA 和蛋白都表达增强 (Fig.1-24, Fig.1-25)。

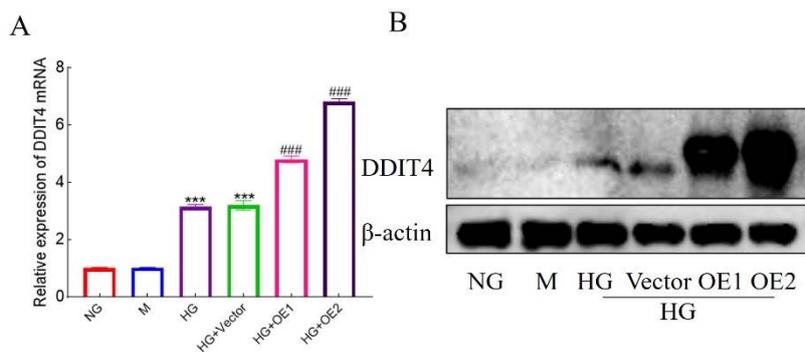


图 1-24 Realtime PCR 和 Western Blot 验证 DDIT4 的过表达效率
 Fig.1-24 The validation of overexpression efficiency of DDIT4 using Realtime PCR and Western Blot, $***/###P<0.001$, * vs NG, # vs HG; OE, DDIT4 过表达, OE1, 3 μ g; OE2, 5 μ g

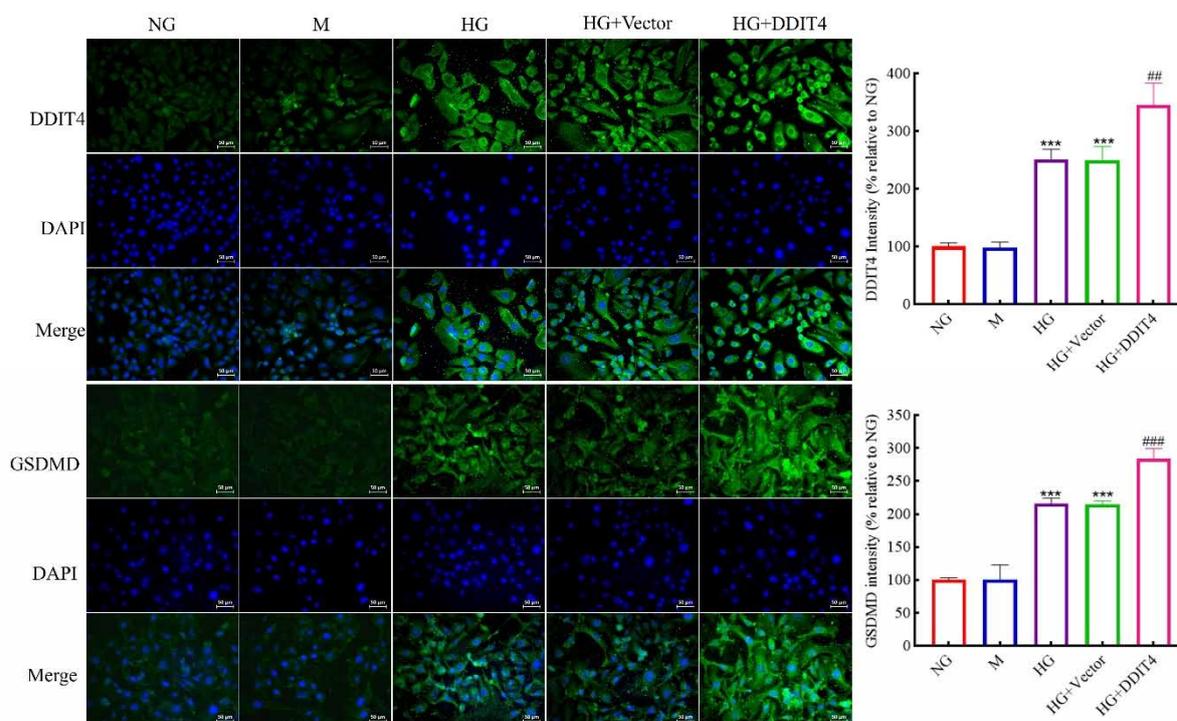


图 1-25 免疫荧光检测过表达 DDIT4 后 DDIT4 和 GSDMD 的表达变化
 ($\times 200$)

Fig.1-25 The Changes of DDIT4 and GSDMD after overexpressing DDIT4 detected by Immunofluorescence, $***, ###P<0.001$, vs NG; $##P<0.01$, vs HG

(2) 过表达 DDIT4 后, 细胞焦亡执行蛋白 GSDMD 的变化: 与 HG 组相比, 过表达 DDIT4 能够进一步上调高糖条件下 HK-2 细胞中 GSDMD-

FL 和 GSDMD-N 的表达，灰度值统计差异具有统计学意义 (Fig.1-26)。

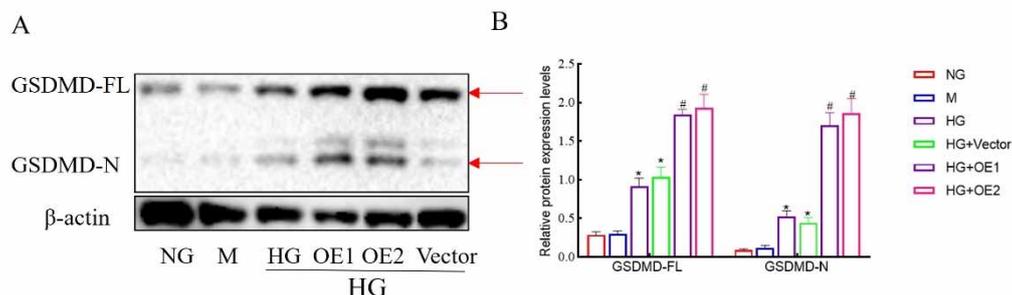


图 1-26 Western Blot 检测 DDIT4 过表达后 GSDMD 变化 (×200)

Fig.1-26 The Changes of GSDMD after overexpressing DDIT4 detected by Western Blot (×200), $^{*}P<0.05$; $^{*}vs$ NG, $^{#}vs$ HG

(3) 过表达 DDIT4 后，免疫荧光检测细胞焦亡执行蛋白 GSDMD 的变化：与 Western Blot 结果一致，与 HG 组细胞相比，过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞 GSDMD 染色进一步加强，差异具有统计学意义 ($P<0.001$) (Fig.1-25)。

(4) 过表达 DDIT4 后，AO/EB 染色检测细胞膜完整性变化：与 HG 组细胞相比，过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞的橘红色荧光染色进一步增多。结果提示：高糖诱导干预下，DDIT4 过表达能够明显加重肾小管上皮细胞膜完整性的受损 (Fig.1-27)。

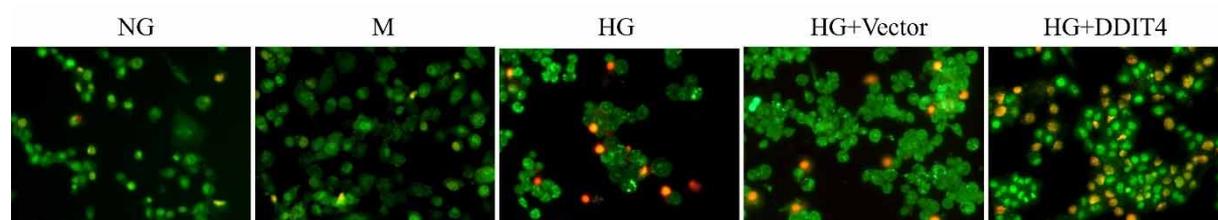


图 1-27 AO/EB 染色检法检测过表达 DDIT4 后 HK-2 细胞膜完整性 (×200)

Fig.1-27 The cell membrane integrity of HK-2 cells after overexpressing DDIT4 detected by AO/EB staining assay (×200)

(5) 过表达 DDIT4 后，乳酸脱氢酶 LDH 活性检测：与 HG 组细胞

相比，过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞释放的 LDH 进一步增多，差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。提示：高糖诱导干预下，过表达 DDIT4 能够明显加重 HK-2 细胞膜破裂 (Fig.1-28)。

(6) 过表达 DDIT4 后，CCK-8 细胞活力检测：与 HG 组细胞相比，过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞的细胞活力进一步减弱，差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。提示：高糖诱导干预下，过表达 DDIT4 能够明显加重 HK-2 细胞活力的降低 (Fig.1-28)。

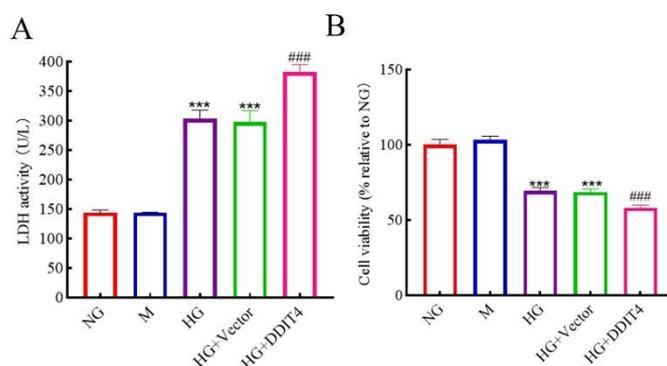


图 1-28 过表达 DDIT4 后 HK-2 细胞乳酸脱氢酶活性和细胞活力变化
Fig.1-28 The changes of LDH activity and cell viability in HK-2 cells after overexpressing DDIT4, ***/### $P<0.001$; * vs NG, #vs HG

(7) 过表达 DDIT4 后，EDU 细胞增殖活性检测：与 HG 组细胞相比，过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞的 EDU 染色进一步减弱，差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。提示：过表达 DDIT4 能够明显加重高糖诱导的 HK-2 细胞增殖活性的降低 (Fig.1-29)。

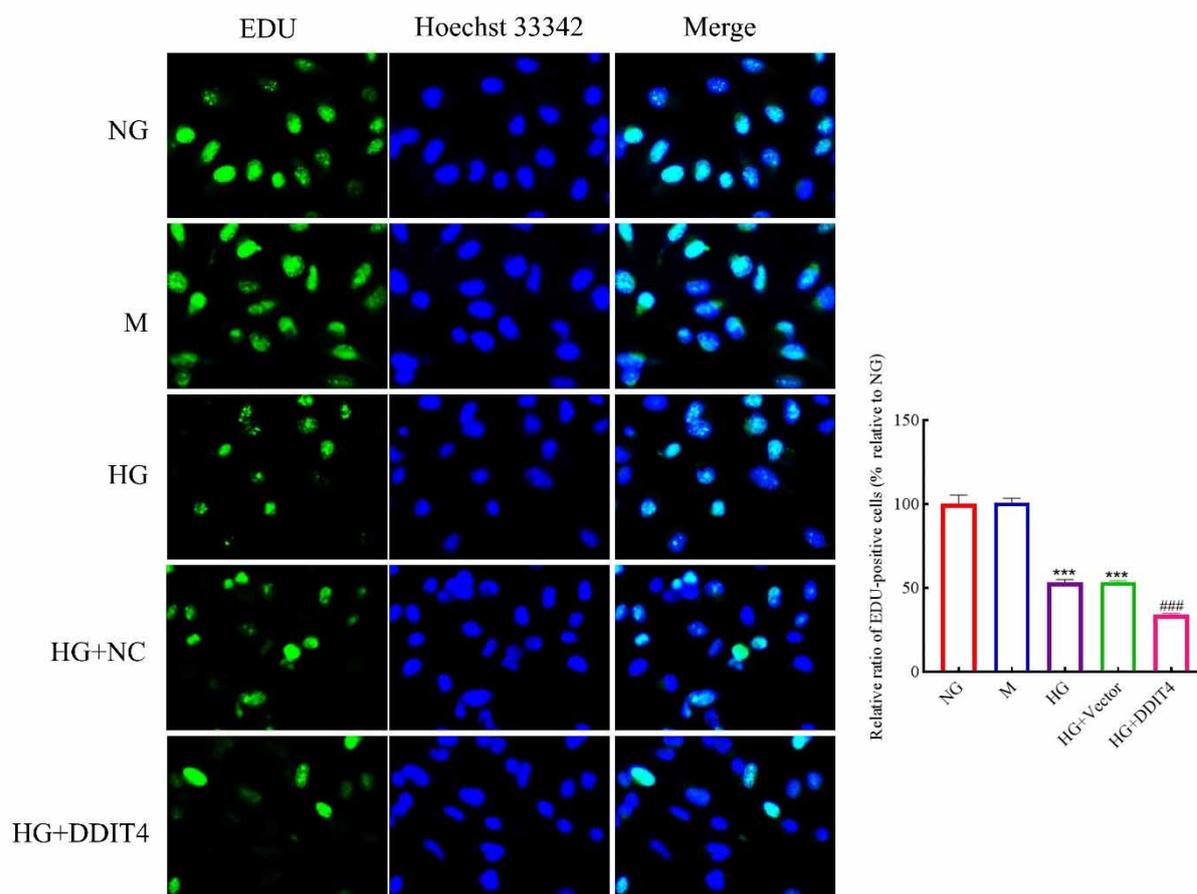


图 1-29 EDU 检测 DDIT4 过表达后 HK-2 细胞的增殖活性 ($\times 200$)

Fig.1-29 The cell proliferation viability of HK-2 after overexpressing DDIT4 detected by EDU ($\times 200$), ***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(8)过表达 DDIT4 后免疫荧光共聚焦分析 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染: 与 HG 组细胞相比, 过表达 DDIT4 质粒的 HK-2 细胞 FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性的细胞进一步增强, 统计结果显示差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (Fig.1-30)。

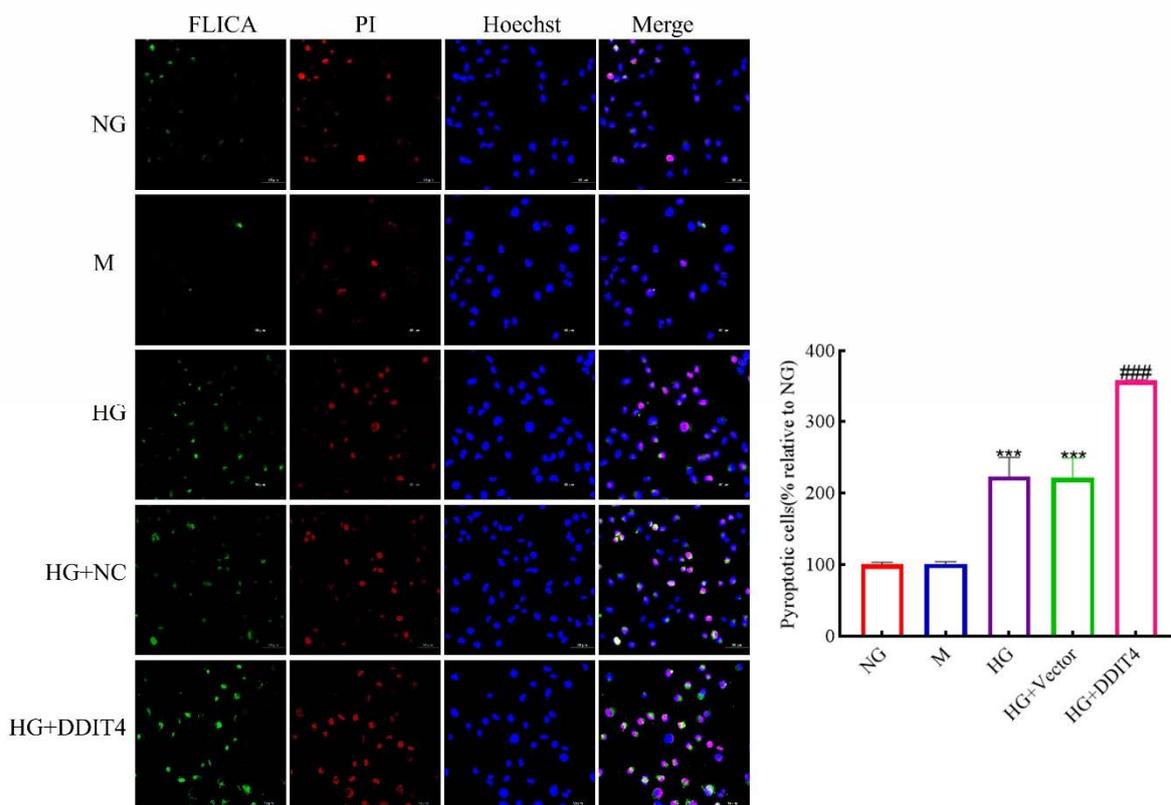


图 1-30 免疫荧光共聚焦检测 DDIT4 过表达后 HK-2 细胞焦亡情况
($\times 200$)

Fig.1-30 The cell pyroptosis in HK-2 cells after overexpressing detected by Immunofluorescence confocal ($\times 200$), ***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(9) 过表达 DDIT4 后流式细胞术检测细胞焦亡: 与 HG 组相比, 过表达 DDIT4 的 HK-2 细胞发生焦亡比例进一步增加。结果显示, 与 FLICA (活性 Caspase-1) 和 PI 双染结果一致, 相比 HG 组, 过表达 DDIT4 能够明显加重高糖诱导的 HK-2 细胞焦亡 (Fig.1-31)。

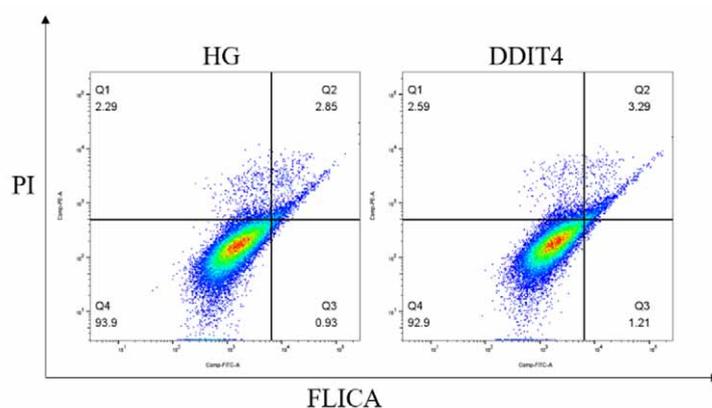


图 1-31 流式细胞术检测 DDIT4 过表达后 HK-2 细胞的焦亡情况

Fig.1-31 The cell pyroptosis in HK-2 cells after overexpressing DDIT4 detected by flow cytometry

以上均提示：过表达 DDIT4 能够加重高糖诱导的 HK-2 细胞焦亡。

(10) 过表达 DDIT4 后 Western blot 检测 HK-2 细胞中纤维化指标的变化：与 HG 组相比，过表达 DDIT4 质粒后，Collagen Type I 和 FN1 蛋白表达进一步增强，灰度值结果统计差异具有统计学意义 (Fig.1-32)。

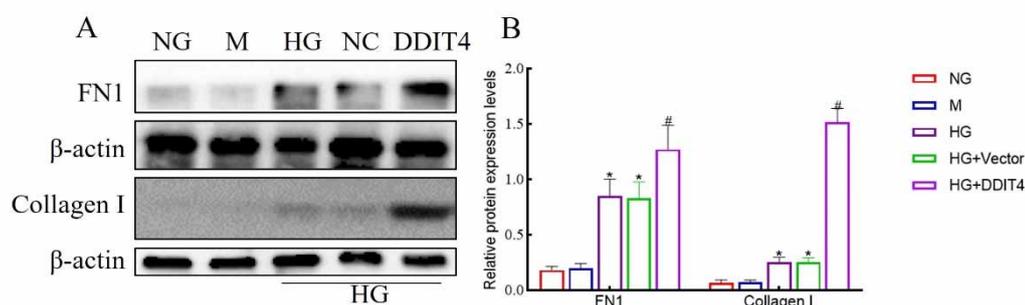


图 1-32 Western blot 检测 DDIT4 过表达后 HK-2 细胞纤维化指标的表达

Fig.1-32 The fibrosis index expression in HK-2 cells after overexpressing DDIT4 detected by Western blot, $^{*}/\#P<0.05$; * vs NG, $^\#$ vs HG

(11) 过表达 DDIT4 后免疫荧光检测 HK-2 细胞中纤维化指标的变化：免疫荧光结果与 Western blot 结果一致，与 HG 组细胞相比，过表达组 HK-2 细胞纤维化指标 Collagen I 和 FN1 的染色显著进一步增强，荧光强度统计结果差异具有统计学意义 (Fig.1-33)。

以上均提示：过表达 DDIT4 能够明显促进高糖诱导的 HK-2 细胞纤维化相关蛋白的生成。

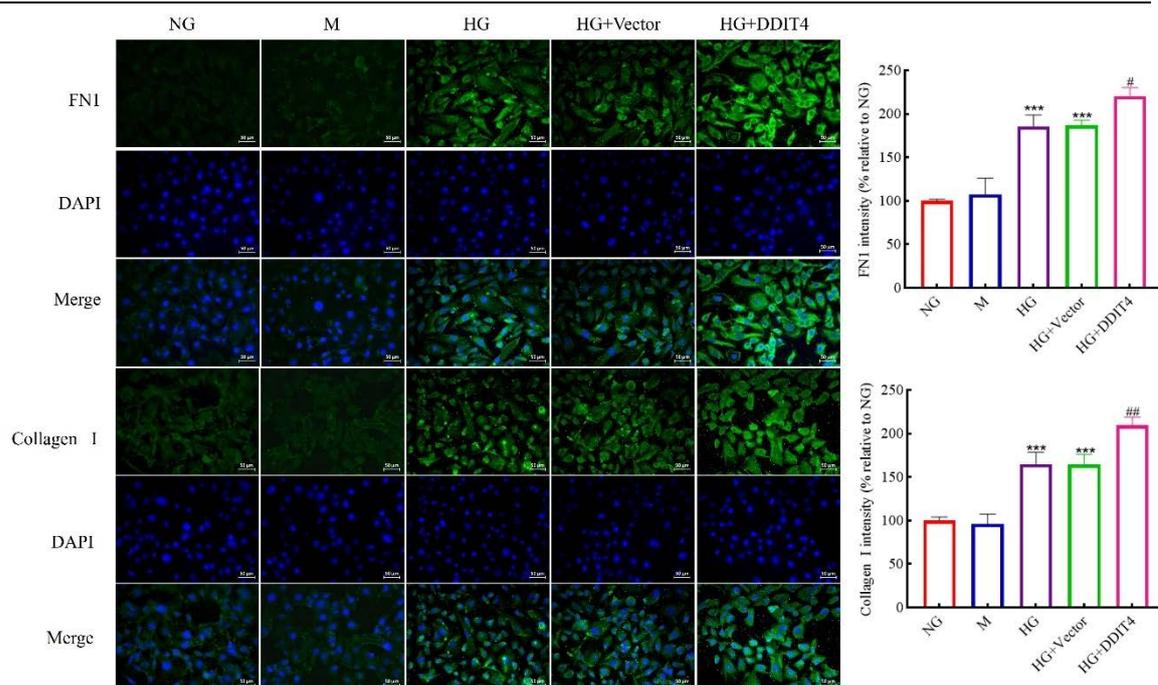


图 1-33 免疫荧光检测 DDIT4 过表达后 HK-2 细胞中 FN1 和 Collagen Type I 的表达情况 (×200)

Fig.1-33 The protein expression of FN1 and Collagen I in HK-2 cells after overexpressing detected by Immunofluorescence (×200)

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; * vs NG, ## vs HG

6. STZ 诱导的糖尿病小鼠中，DDIT4 对肾脏细胞焦亡及肾损伤的调控作用

(1) Western Blot 验证小鼠中 DDIT4 的敲除：与 WT 组相比，STZ-WT 组小鼠肾皮质中 DDIT4 的表达明显增多；DKO 组和 STZ-DKO 组小鼠肾脏组织中未见 DDIT4 的表达 (Fig.1-34)。

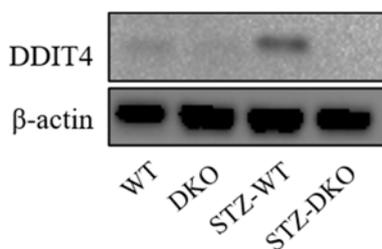


图 1-34 Western Blot 检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾组织 DDIT4 表达

Fig.1-34 The expression of DDIT4 in Renal Tissue of STZ-induced diabetes Mice detected by western blot

(2) 敲除 DDIT4 小鼠的肾脏病理变化, Masson 染色和 PAS 染色后光镜下观察, 可见 WT 组和 DKO 组小鼠的肾小球和肾小管结构正常, 细胞外基质未见明显增生, 毛细血管腔开放良好。与 WT 组相比, STZ 诱导的糖尿病小鼠的肾小球体积变大, 系膜基质增多, 基底膜存在不规则增厚。此外, STZ-DKO 组小鼠的肾小球和肾小管的形态结构明显改善, 提示: 敲除 DDIT4 基因能够改善 STZ 诱导的糖尿病所引起的小鼠肾脏形态学改变 (Fig.1-35)。

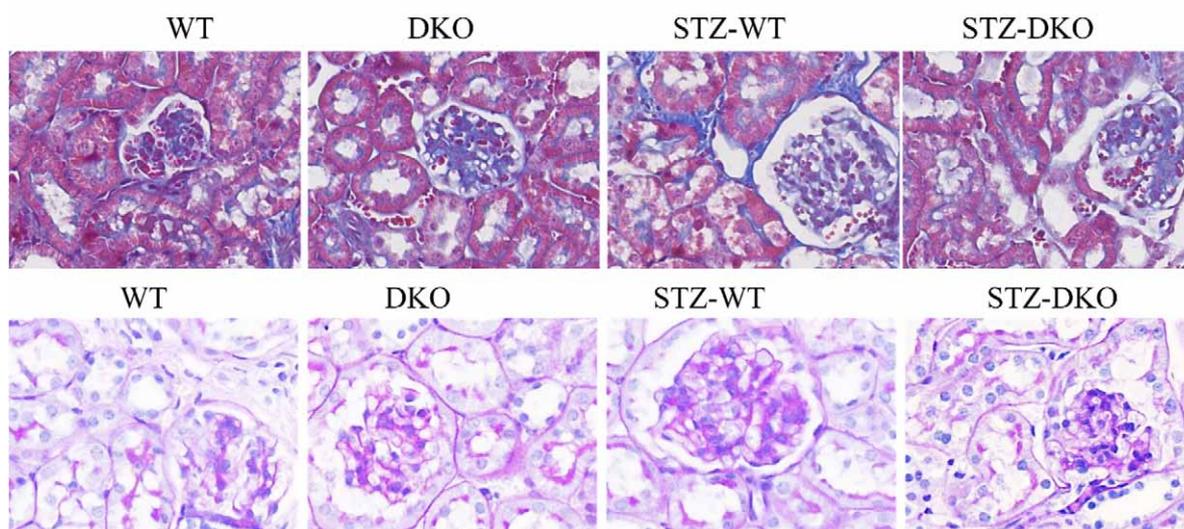


图 1-35 STZ 诱导的糖尿病肾病小鼠肾组织 Masson 和 PAS 染色
Fig.1-35 Masson and PAS staining of kidney tissue in STZ-induced diabetes nephropathy mice ($\times 200$)

(3) 敲除 DDIT4 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏代谢指标的影响
与 WT 组小鼠相比, DKO 组小鼠的 BG、KW、BW、UAE、UACR、BUN 和 Scr 水平无明显差别, 糖尿病组小鼠的 BG、KW、UAE、UACR、BUN 和 Scr 则显著增高, 且其 BW 显著降低。与 STZ-WT 组小鼠比较, STZ-DKO 组小鼠的 KW 和 BW 无明显改变, 但是 BG、UAE、UACR、BUN 和 Scr 水平明显下降, 提示 DDIT4 基因的缺失可显著降低糖尿病组小鼠升高的 BG、UAE、UACR、BUN 和 Scr (Fig.1-36; Fig.1-37)。

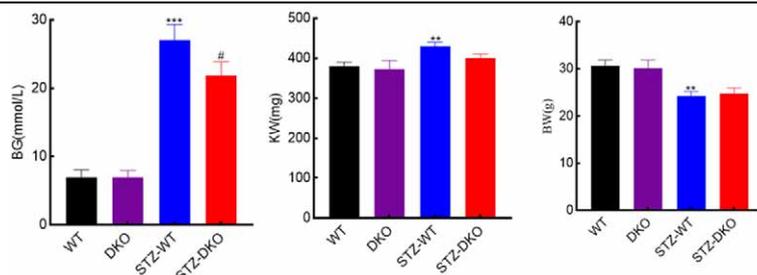


图 1-36 1 不同处理组小鼠的血糖、肾重、体重的变化

Fig. 1-36 The changes of BG、KW and BW of mice in different treatment groups, [#] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; * vs WT, [#] vs STZ-WT

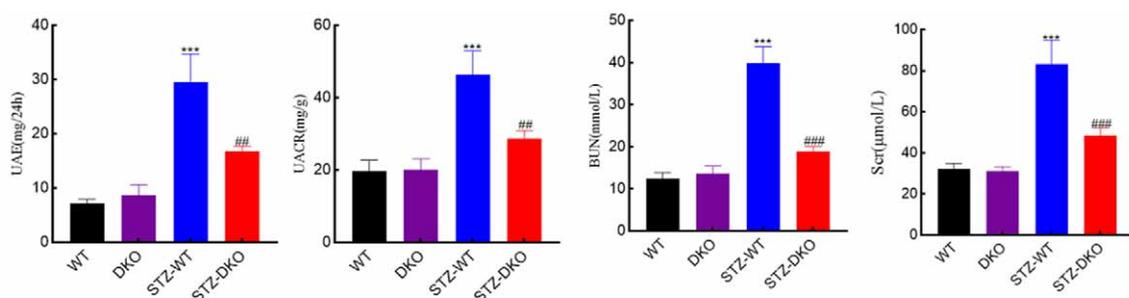


图 1-37 不同处理组小鼠生化指标的变化

Fig. 1-37 The changes of metabolic parameters of mice in different treatment groups, ^{##} $P < 0.01$, ^{***/###} $P < 0.001$; * vs WT, [#] vs STZ-WT

(4) 敲除 DDIT4 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏细胞焦亡的影响

Western Blot 结果显示, 对比 WT 组小鼠, STZ-WT 组小鼠肾组织的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N 蛋白表达水平均显著增加, 而 DDIT4 基因敲除可以使糖尿病小鼠肾脏组织的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N 的蛋白表达下降(Fig.1-38)。另外, 免疫组织化学结果显示, 相比于 WT 组, GSDMD 的表达在 STZ-WT 组显著升高。对于 STZ-WT 组, STZ-DKO 组 GSDMD 的表达降低。提示: 敲除 DDIT4 基因可以逆转 STZ 诱导的糖尿病引起的小鼠肾脏细胞焦亡 (Fig. 1-39)。

(5) 敲除 DDIT4 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏纤维化的影响

Western Blot 结果显示, 对比 WT 组小鼠, STZ-WT 组小鼠肾组织的 FN1 和 Collagen Type I 蛋白表达均显著增加, 而 DDIT4 基因敲除可以使糖尿病小鼠肾脏组织的 FN1 和 Collagen I 的蛋白表达下降 (Fig.1-38)。另外, 免疫组织化学结果显示, 相比于 WT 组, FN1 和 Collagen I 的表达在

STZ-WT 组显著升高。对于 STZ-WT 组，STZ-DKO 组 FN1 和 Collagen I 的表达降低。提示：敲除 DDIT4 基因可以逆转 STZ 诱导的糖尿病引起的小鼠肾脏组织纤维化 (Fig. 1-39)。

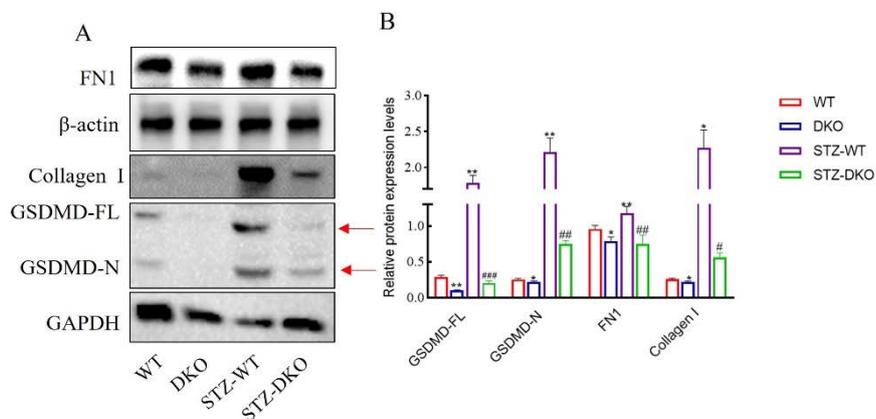


图 1-38 Western Blot 检测敲除 DDIT4 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾组织 GSDMD 和纤维化蛋白的影响

Fig. 1-38 the effect of DDIT4 Knockout on GSDMD and Fibrosis Protein in Kidney Tissue of STZ-induced diabetes mice detected by Western Blot

*/# $P < 0.05$, **/### $P < 0.01$, ###/ $P < 0.001$; * vs WT, # vs STZ-WT

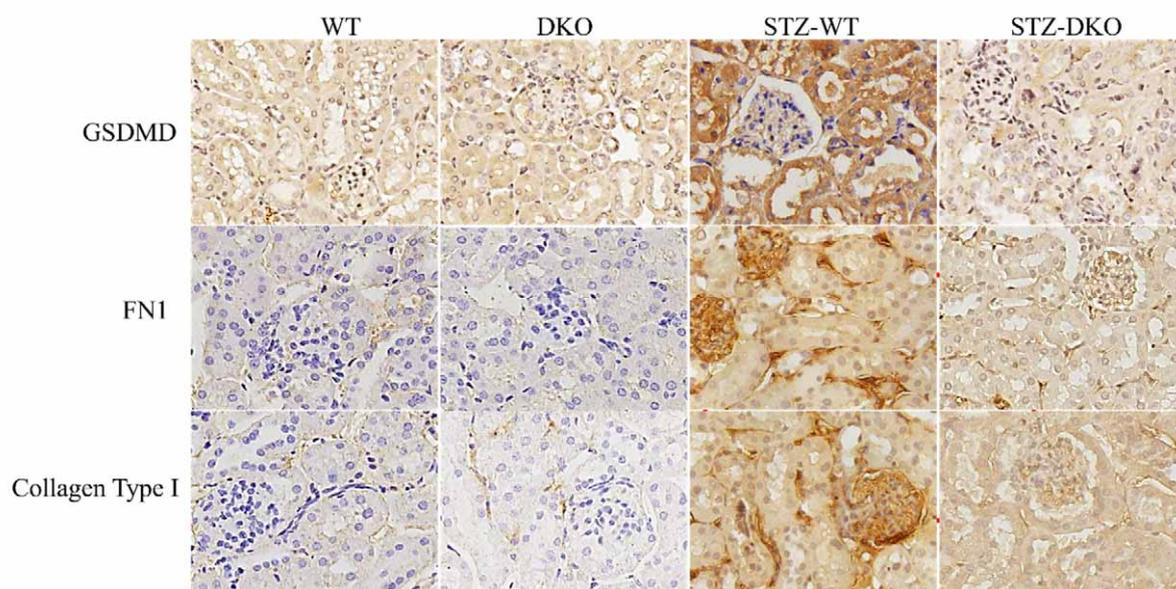


图 1-39 免疫组化检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠敲除 DDIT4 后肾脏组织 GSDMD 和纤维化蛋白的表达 (×200)

Fig.1-39 The GSDMD and Fibrosis Protein expression in renal tissue of STZ-induced diabetes mice after DDIT4 Knockout detected by IHC (×200)

7. db/db 糖尿病小鼠中，DDIT4 对肾脏细胞焦亡及肾损伤的调控作用

(1) Realtime PCR 和 Western Blot 验证小鼠中 DDIT4 的敲低: DDIT4 在 db/db 组和 db/db-control 组小鼠肾脏组织中的 mRNA 和蛋白质表达水平明显高于 db/m 组。且 db/db-shDDIT4 组，即肾盂原位注射 DDIT4 敲低质粒组的 db/db 小鼠肾组织中，DDIT4 mRNA 和蛋白质表达被抑制 (Fig.1-40)。

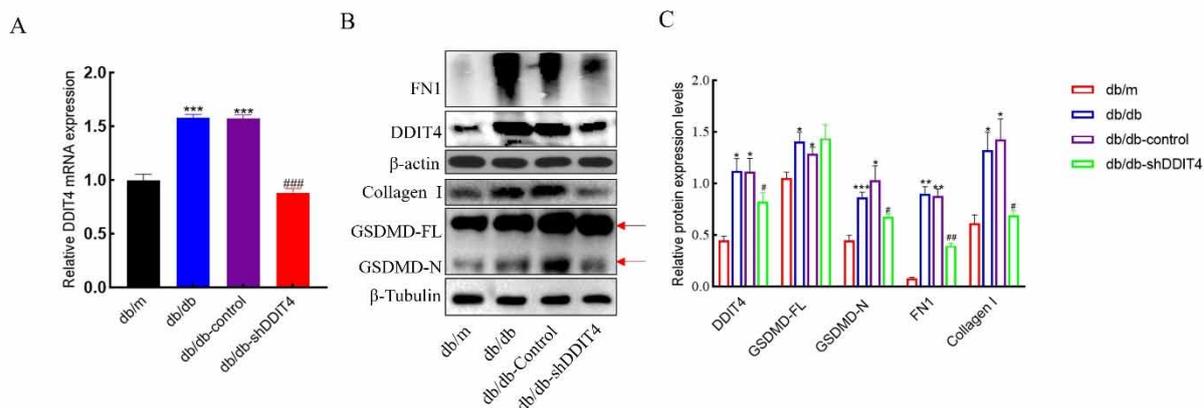


图 1-40 Western Blot 检测 db/db 糖尿病小鼠肾组织 DDIT4、GSDMD 和纤维化指标的表达

Fig.1-40 The expression of DDIT4, GSDMD and fibrosis indicator proteins in Renal Tissue of db/db diabetes mice detected by western blot

* $\#P < 0.05$, ** $\#\#P < 0.01$, *** $P < 0.001$; *vs db/m, #vs db/db

(2) 免疫组织化学检测各组小鼠肾脏组织中 DDIT4 的表达: 免疫组织化学染色结果显示: 相比于 db/m 组, DDIT4 在 db/db 组和 db/db-control 组小鼠肾脏组织中存在广泛的胞浆染色, 敲低 DDIT4 后, db/db 小鼠 DDIT4 蛋白质的表达降低 (Fig.1-41)。

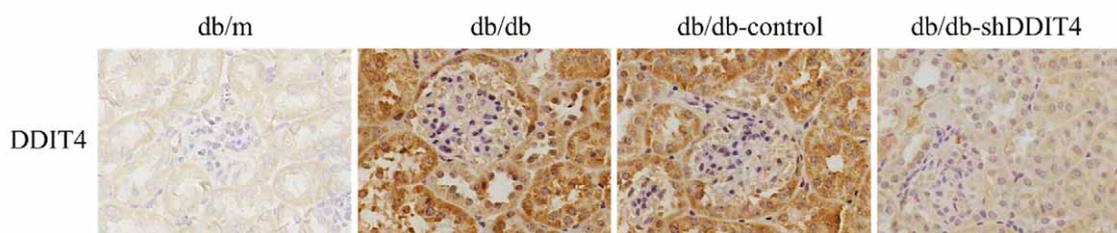


图 1-41 免疫组化检测 db/db 糖尿病小鼠肾 DDIT4 的表达 ($\times 200$)

Fig. 1-41 IHC detection of the expression of DDIT4 in renal tissue of db/db

diabetes mice ($\times 200$)

(3) 敲低小鼠的肾脏病理变化, Masson 染色和 PAS 染色后, 光镜下观察可见: 与 db/m 小鼠相比, db/db 组和 db/db-control 组的小鼠, 肾小球体积明显增大, 系膜区扩宽, 系膜基质增多。敲低 DDIT4 后上述症状明显改善 (Fig.1-42)。

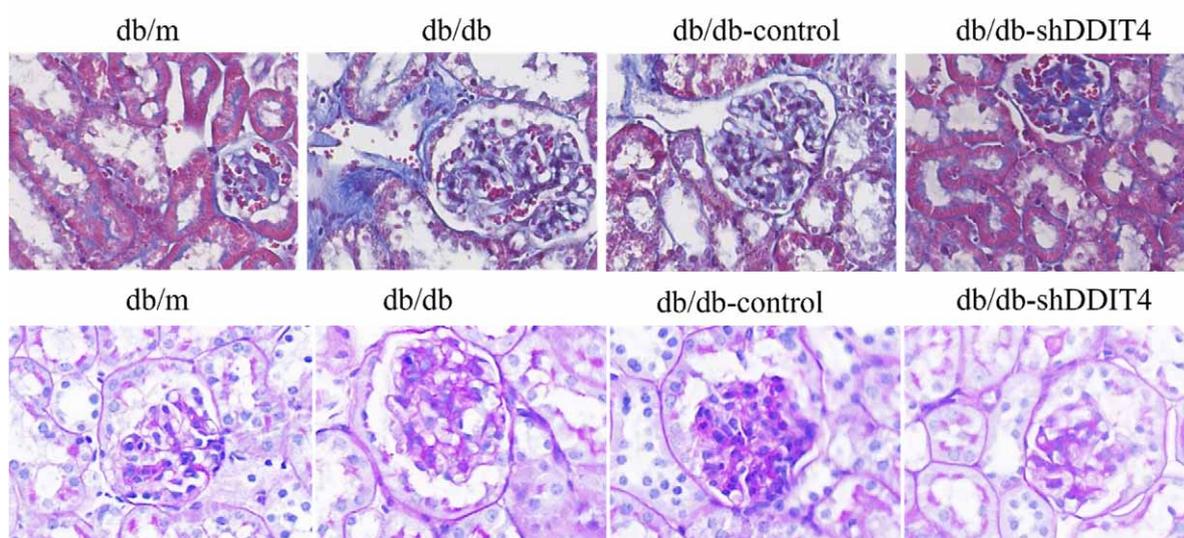


图 1-42 db/db 糖尿病小鼠肾组织 Masson 和 PAS 染色 ($\times 200$)

Fig. 1-42 Masson and PAS staining of kidney tissue in db/db diabetes mice ($\times 200$)

(4) 敲低 DDIT4 对 db/db 糖尿病小鼠肾脏代谢指标的影响

进一步分析 DDIT4 敲低后, 小鼠肾脏各种代谢指标的变化, 结果显示: 与 db/m 组比, db/db 组和 db/db-control 组小鼠的 BW 和 BG 明显增加, 且血糖均高于 16.7 mmol/L, KW 变化不明显。另外, UAE, UACR, BUN 和 Scr 也显著增高。DDIT4 敲低后, db/db 小鼠的上述代谢指标均有所下降, 且差异具有统计学意义 (Fig.1-43; Fig.1-44)。

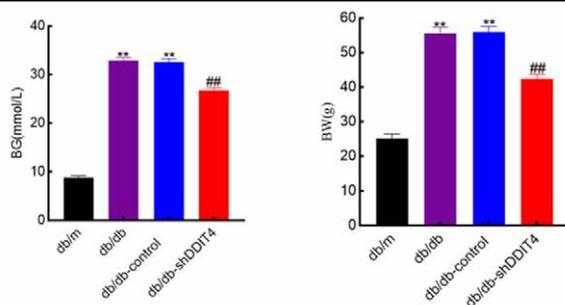


图 1-43 不同处理组小鼠的血糖、体重的变化

Fig. 1-43 The Changes of BG and BW of mice in different treatment groups

*, vs db/m, #, vs db/db; **/##, $P < 0.01$

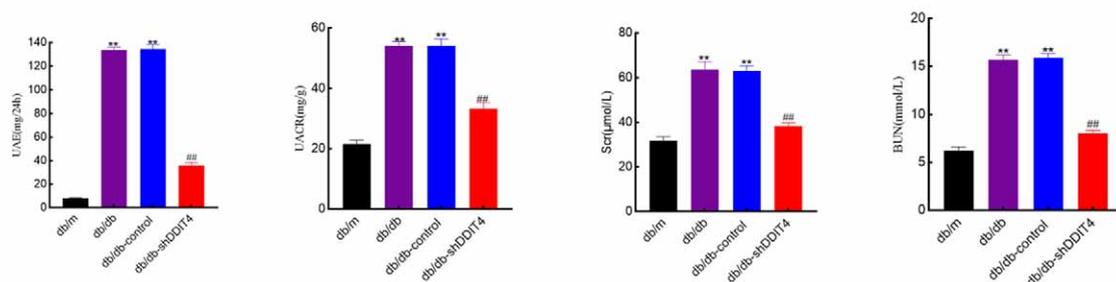


图 1-44 不同处理组小鼠生化指标的变化

Fig. 1-44 The Changes of metabolic parameters of mice in different treatment groups, **/## $P < 0.01$; * vs db/m, # vs db/db

(5) 敲低 DDIT4 对 db/db 小鼠肾脏细胞焦亡的影响

Western Blot 结果显示, 对比 db/m 组小鼠, db/db 组小鼠肾组织的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N 蛋白表达水平均显著增加, 而敲低 DDIT4 后糖尿病小鼠的 GSDMD-FL 和 GSDMD-N 的蛋白表达下降 (Fig.1-40)。另外, 免疫组织化学结果显示, 相比于 db/m 组, GSDMD 的表达在 db/db 组显著升高。对于 db/db 组, db/db-shDDIT4 组 GSDMD 的表达降低。提示: 敲低 DDIT4 可以缓解 db/db 糖尿病引起的小鼠肾脏细胞焦亡 (Fig. 1-45)。

(6) 敲低 DDIT4 对 db/db 小鼠肾脏纤维化的影响

Western Blot 结果显示, 对比 db/m 组小鼠, db/db 组小鼠肾组织的 FN1 和 Collagen Type I 蛋白表达水平均显著增加, 而敲低 DDIT4 后糖尿病小鼠的 FN1 和 Collagen Type I 的蛋白表达下降 (Fig.1-40)。另外, 免疫组织化学结果显示, 相比于 db/m 组, FN1 和 Collagen I 在 db/db 组染色加强。对于 db/db 组, db/db-shDDIT4 组 FN1 和 Collagen I 染色减弱。提

示：敲低 DDIT4 基因可以缓解 db/db 糖尿病引起的小鼠肾脏组织纤维化 (Fig. 1-45)。

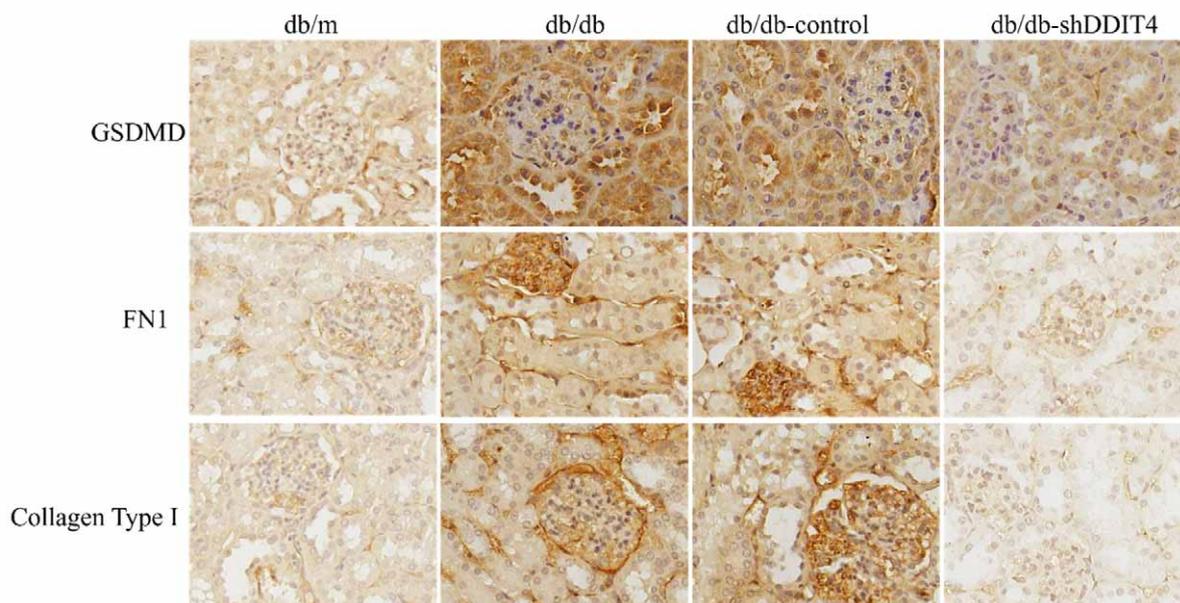


图 1-45 免疫组化检测 db/db 糖尿病小鼠肾组织 GSDMD 和纤维化指标的表达 (×200)

Fig. 1-45 The GSDMD and fibrosis protein expression in renal tissue of db/db diabetes mice after Knocking down DDIT4 detected by IHC (×200)

讨 论

随着人类社会经济的发展,人们的生活方式和饮食结构发生了巨大的变化,随之而来的代谢异常疾病如:糖尿病、高脂血症等的发病率也呈逐年上升的趋势。糖尿病肾病是糖尿病患者最常见、最严重的慢性合并症。据估计,中国糖尿病合并慢性肾脏疾病患者人数达到 2430 万^[8]。世界糖尿病患病率正在迅速增长,尤其是在发展中国家。随着糖尿病发病率的增加,倘若针对糖尿病肾病的临床预防策略并未立即改善,预计随之而来的就是糖尿病肾病的增加。DN 的发病机制非常复杂,目前尚不完全清楚,导致治疗效果差。

肾小管病变在早期 DN 中的重要性越来越被认为是 DN 进展的关键组成部分。当肾脏暴露在高糖环境中时,肾小管上皮细胞是损伤的初始部位,小管上皮细胞的脱落和凋亡最终导致肾纤维化和 ESRD 的发生和进展^[12]。越来越多的证据支持肾小管损伤在 DN 中的作用,人们的兴趣已经

转移到近端小管,近端小管可能在糖尿病条件下肾脏疾病的早期发病机制中起到引发、驱动或贡献者的作用。DN 肾小管损伤的机制是复杂的,了解肾小管损伤机制可能有助于对 DN 进行新的治疗干预。

DDIT4 是一种应激诱导蛋白,早期由细胞应激诱导。其表达受 HIF-1、p53 或 ATF4-C/EBP β 6-9 等特定转录因子激活的精细调控^[13]。DDIT4 最具特征的功能是抑制 mTORC1, mTORC1 是一种整合细胞外信号和细胞内对营养物质、生长因子或应激反应的主调节激酶。mTORC1 调控在细胞生长、增殖、和代谢中起着至关重要的作用^[14]。DDIT4 是一种保守且普遍存在的蛋白质,在多种刺激下被瞬时诱导。作为 Akt/mTOR 信号通路的内源性抑制剂,DDIT4 蛋白已被证明可以调节细胞生长,线粒体功能,氧化应激和凋亡。目前已有明确研究证实 DDIT4 与糖尿病及其并发症的研究紧密相关,但是关于 DDIT4 和糖尿病肾病的研究知之甚少。有研究报告 1,25(OH)₂D₃ 可有效抑制高血糖诱导的系膜细胞增殖,从而抑制糖尿病肾病的发展,并且表明 1,25(OH)₂D₃ 的肾保护作用部分是通过 DDIT4/TSC2/mTOR 途径介导的^[15,16]。Michael D. Dennis 团队报道在 STZ 诱导糖尿病 16 周后发现,小鼠出现蛋白尿和肾脏肥大,同时肾脏 DDIT4 表达增加。相比之下,糖尿病 DDIT4 基因敲除小鼠没有表现出肾脏生理功能受损^[13]。迄今为止,关于 DDIT4 对糖尿病肾病中肾小管上皮细胞的作用未见报道。本部分研究探索了 DDIT4 在糖尿病肾脏肾小管上皮细胞损伤中的作用。结果显示,DDIT4 在高糖刺激下,呈时间依赖性增加,48h 达到高峰。在 1 型和 2 型糖尿病小鼠的肾脏组织中,同样检测到 DDIT4 的异常高表达,说明 DDIT4 可能对糖尿病肾病有重要作用。进一步本部分应用 1 型和 2 型糖尿病小鼠模型研究 DDIT4 对糖尿病小鼠的作用。DDIT4 基因缺失的小鼠模型(STZ-DKO 组)和敲低 DDIT4 的 db/db 小鼠(db/db-shDDIT4 组)中,一些升高的反映肾功能的生化指标(如 UAE, UACR, BUN 和 Scr 等)得到明显改善。并且 Masson 染色和 PAS 染色结果表明,STZ 小鼠敲除 DDIT4 和 db/db 小鼠敲低 DDIT4 后,糖尿病所引起的肾小球体积增大、系膜区增宽、基底膜不规则增厚及细胞外基质增加等病理变化得到明显改善。提示降低 DDIT4 的表达水平可以改善糖尿病引起的肾脏损害。

焦亡是一种特殊类型的裂解性程序性细胞死亡，其特征是细胞肿胀、破裂、细胞内容物分泌和显著的促炎作用^[17]。GSDMD 是 Gasdermin 家族的关键成员，是焦亡的 executor，可被 Caspase-1/4/5/11 切割和激活。GSDMD 的 N-末端片段在膜中寡聚形成孔，诱导细胞因子的释放，导致焦亡的发生。在正常生理状态下，适度的细胞焦亡发生，能够释放适量的促炎症因子，通过进一步募集中性粒细胞、巨噬细胞等免疫细胞清除有害物质。但是过度的细胞焦亡，则会促使机体释放更多的促炎症因子，进而通过 NADPH 氧化酶系统产生更多的活性氧，炎症小体进一步活化，诱导细胞焦亡的发生，更多的炎症因子进一步释放，最终形成恶性循环。日益增多的证据报道了细胞焦亡在糖尿病肾病中发挥关键作用。本部分通过高糖刺激 HK-2 细胞，发现同 DDIT4 一样，肾小管上皮细胞中的 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路也呈时间依赖性激活，同样在 48h 达到高峰。AO/EB 双染检测到高糖干预下 HK-2 的细胞膜完整性受损。另外 CCK-8 和 EDU 实验结果显示 HG 组细胞活力和增殖活性的降低，LDH 活性检测实验显示高糖刺激的 HK-2 细胞释放更多的 LDH。FLICA/PI 免疫荧光共聚焦和流式检测，显示高糖环境下的 HK-2 细胞中，FLICA⁺/PI⁺细胞比例增多。以上说明高糖刺激下，肾小管上皮细胞发生了细胞焦亡。在糖尿病肾病中，细胞焦亡的触发机制尚不十分清楚。本部分还探讨了应激诱导蛋白 DDIT4 在糖尿病肾病时是否会导致肾小管上皮细胞焦亡。高糖环境下，HK-2 细胞中分别敲低、过表达 DDIT4 后，检测细胞焦亡各指标的变化。敲低 DDIT4 后上述表型有所改善，并且 GSDMD-FL 和活性片段 GSDMD-N 表达减少；而过表达 DDIT4 的 HK-2 细胞，上述表型进一步加重，并且 GSDMD-FL 和活性片段 GSDMD-N 表达进一步增多。此外，1 型糖尿病小鼠和 2 型糖尿病小鼠模型中，DDIT4 基因缺失或者敲低，Western Blot 和 IHC 检测结果显示 GSDMD 随之降低。以上说明 DDIT4 在糖尿病肾病时调控小管细胞焦亡的发生。

肾固有细胞的焦亡在 DN 进展中强烈影响肾功能^[18, 19]。焦亡引起的炎症和细胞损伤与 DN 的进展密切相关，在 DN 的发展过程中，持续肾损伤后未解决的炎症可以促进纤维形成阶段，从而导致后期胶原沉积和积聚，导致肾实质逐渐硬化和瘢痕形成，直到肾功能完全衰竭。作为一种特殊的细胞死亡形式，焦亡就像一把双刃剑：一方面，适度的细胞死亡有利于保

护肾脏免受内部和外部损伤。而另一方面，大量的肾脏固有细胞焦亡会导致严重的炎症反应，这是促进 DN 进展的主要因素。本部分实验结果显示，高糖刺激的 HK-2 细胞中，纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen Type I 表达增多，敲低 DDIT4 后表达下降，而在过表达后与之相反。进一步，在 DDIT4 基因缺失的 1 型糖尿病小鼠和 DDIT4 敲低的 2 型糖尿病小鼠中得到了再次验证。提示 DDIT4 在糖尿病肾病时可能通过触发细胞焦亡进一步调控肾小管上皮细胞的纤维化。

综上所述，高糖刺激下，DDIT4 和 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路呈时间依赖性激活，48h 达到高峰。敲除 DDIT4 的 1 型糖尿病小鼠和敲低 DDIT4 的 2 型糖尿病小鼠的肾功能显著改善。另外，干预 DDIT4 的表达后，无论是在细胞水平还是在 1/2 型糖尿病小鼠肾脏组织中，焦亡执行蛋白 GSDMD，以及纤维化指标蛋白 FN1 和 Collagen Type I 的表达均随之改变。

小 结

1. 高糖诱导肾小管上皮细胞发生 NLRP3/ Caspase-1/GSDMD 炎症信号通路活化。
2. DDIT4 介导了高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡。
3. DDIT4 促进糖尿病肾病状态下肾脏纤维化。

参考文献

1. Liu H, Feng J, Tang L. Early renal structural changes and potential biomarkers in diabetic nephropathy[J]. *Front Physiol*, 2022, 13:1020443.
2. Ram C, Gairola S, Verma S, et al. Biochanin A Ameliorates Nephropathy in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects on NF- κ B/NLRP3 Axis, Pyroptosis, and Fibrosis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5).
3. Lin J, Cheng A, Cheng K, et al. New Insights into the Mechanisms of Pyroptosis and Implications for Diabetic Kidney Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19).
4. Stevens SA, Gonzalez Aguiar MK, Toro AL, et al. PERK/ATF4-dependent expression of the stress response protein REDD1 promotes proinflammatory cytokine expression in the heart of obese mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2023, 324(1):E62-62E72.
5. Michel G, Matthes HW, Hachet-Haas M, et al. Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 4):773-787.
6. Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(10):4675-4680.
7. del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Ji D, et al. RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride[J]. *Brain Res Bull*, 2013, 98:132-144.
8. Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in Chronic Kidney Disease in China[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9):905-906.
9. Williamson DL, Dungan CM, Mahmoud AM, et al. Aberrant REDD1-mTORC1 responses to insulin in skeletal muscle from Type 2 diabetics[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015, 309(8):R855-863.
10. McGhee NK, Jefferson LS, Kimball SR. Elevated corticosterone

associated with food deprivation upregulates expression in rat skeletal muscle of the mTORC1 repressor, REDD1[J]. *J Nutr*, 2009, 139(5):828-834.

11. Sunilkumar S, Toro AL, McCurry CM, et al. Stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced retinal inflammation by sustaining canonical NF- κ B signaling[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(12):102638.

12. Zhou X, Xu C, Dong J, et al. Role of renal tubular programmed cell death in diabetic kidney disease[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2023, 39(2):e3596.

13. Sunilkumar S, Yerlikaya EI, Toro AL, et al. REDD1 Ablation Attenuates the Development of Renal Complications in Diabetic Mice[J]. *Diabetes*, 2022, 71(11):2412-2425.

14. Lipina C, Hundal HS. Is REDD1 a Metabolic Éminence Grise?[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(12):868-880.

15. Wang H, Wang J, Qu H, et al. In vitro and in vivo inhibition of mTOR by 1,25-dihydroxyvitamin D3 to improve early diabetic nephropathy via the DDIT4/TSC2/mTOR pathway[J]. *Endocrine*, 2016, 54(2):348-359.

16. Chen DP, Ma YP, Zhuo L, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the proliferation of rat mesangial cells induced by high glucose via DDIT4[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1):418-427.

17. Hsu SK, Li CY, Lin IL, et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18):8813-8835.

18. Fu J, Wei C, Zhang W, et al. Gene expression profiles of glomerular endothelial cells support their role in the glomerulopathy of diabetic mice[J]. *Kidney Int*, 2018, 94(2):326-345.

19. Gu J, Huang W, Zhang W, et al. Sodium butyrate alleviates high-glucose-induced renal glomerular endothelial cells damage via inhibiting pyroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75:105832.

第二部分

DDIT4 通过调控 NLRP3 炎症小体激活对高糖诱导的肾小管细胞焦亡的影响

前 言

糖尿病肾病是一种慢性炎症性疾病，影响着全球数百万糖尿病患者。肾纤维化伴随着细胞外基质蛋白的过度积累，如肾小球和肾小管间质中的纤连蛋白（FN1）和各种胶原蛋白^[1]，是几乎所有晚期 DN 的常见最终途径^[2]。在器官损伤的早期阶段，纤维化通常由持续数月的免疫反应引起的慢性炎症引起，其中炎症、组织重塑和修复过程同时发生。因此，慢性炎症是 DN 的特征，通常是纤维化过程的诱因。因此炎症反应是 DN 重要的发病机制之一，涉及诸多细胞因子及信号转导通路，参与 DN 各个时期的病理过程，对病情进展的评估及预后的评判具有重要意义，抗炎症反应是 DN 治疗的重要靶点。

细胞焦亡是一种促炎形式的调节性细胞死亡。焦亡是近年来生物科学研究的热点，具有天然免疫炎症的特殊性。焦亡涉及阿尔茨海默病^[3]、帕金森病^[4]和其他神经退行性疾病、动脉粥样硬化^[5]、类风湿性关节炎^[6]和其他慢性进行性疾病的研究。目前已发现 DN 的一些危险因素，包括高糖、氧化应激、异常脂质代谢和晚期糖基化终产物，均与细胞焦亡密切相关^[7]。焦亡主要通过炎症小体介导包含 Caspase-1 在内的多种 Caspase 的激活，造成包括 GSDMD 在内的多种 Gasdermin 家族成员发生剪切和多聚化，造成细胞穿孔，进而引起细胞死亡。相比于细胞凋亡，相同点是：胞核浓缩、DNA 断裂、Tunnel 染色阳性；不同点是：凋亡时细胞膜保持完整、凋亡小体形成，细胞焦亡时常伴有大量炎性细胞因子和炎性细胞内含物释放，伴有细胞膜孔形成，细胞渗透性肿胀，细胞内含物流出，最终导致细胞裂解死亡。焦亡的核心是激活 NLRP3 炎症小体，伴随 NLRP3 炎性体的活化，激活 IL-1 β 和 IL-18 并触发细胞焦亡，GSDMD 是细胞焦亡的决定性执行者，负责执行细胞焦亡和促使成熟的炎性因子释放。NLRP3 为 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain

associated protein 3), 是 NOD 样受体家族中重要的一员, 其炎性小体复合物由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和半胱天冬酶-1 前体 (pro-cysteiny l aspartate specific proteinase-1, pro-caspase-1) 组成。NLRP3 是一种细胞质蛋白, 具有三个结构域: 一个 N 端吡啶结构域 (pyrin domain, PYD)、一个中央核苷酸结合寡聚结构域 (nucleoside triphosphatase domain, NACTH domain) 和一个 C 末端富含亮氨酸的重复序列 (leucine-rich repeat, LRR)。当 NLRP3 感应到危险信号时, 会同 ASC 的 PYD 相互作用而结合, 之后 ASC 通过相同的 CARD 募集 Caspase-1 前体 (pro-caspase-1) 进而聚集成 NLRP3 炎性小体, 被激活的炎性小体促使 ASC 切割 pro-caspase-1 成为具有活性的 Caspase-1, 该分子继而促进 IL-1 β 与 IL-18 成熟, 诱导炎症。NLRP3 在炎症反应中作为一个重要的分子, 已被证实在糖尿病肾病中有重要作用^[8-10]。在糖尿病小鼠肾脏中 NLRP3 高表达, 相比较野生型的糖尿病小鼠, 糖尿病 NLRP3-KO 小鼠中, 肾脏组织的活性 Caspase-1, Cleaved-IL-1 β , IL-18 减少, NLRP3 缺失缓解了糖尿病小鼠肾脏组织的炎症^[9]。另外, 敲除 NLRP3 可拮抗高糖诱导的肾小管细胞的上皮-间充质转换^[10]。有研究发现 DDIT4 缺失小鼠中, 骨髓源性巨噬细胞 (BMDM) 和脂肪组织在 LPS 刺激下, p38 MAPK, JNK 和 NF- κ B 以及 NLRP3 炎症小体的激活和 IL-1 β 的产分泌减弱。DDIT4 通过 NF- κ B 依赖而 mTORC1-非依赖的途径实现 NLRP3 炎症小体的激活^[11]。这提示 DDIT4 和 NLRP3 炎症小体之间可能存在相关性。据检索文献, 关于 DDIT4 和 NLRP3 炎症小体在糖尿病肾病的调控作用目前未见报道。本部分研究, 以人肾小管上皮细胞、STZ 诱导的糖尿病小鼠和 db/db 糖尿病小鼠为研究对象, 探讨糖尿病肾病状态下, DDIT4 对 NLRP3 炎症小体激活是否存在调控作用。

材料与方法

1. 材料

1.1 仪器

T100 Thermal Cycler PCR 仪
水平电泳槽

美国 Bio-Rad 科技公司
北京六一生物科技公司

水浴锅	上海一恒仪器公司
紫外切胶仪	北京兰杰柯科技有限公司
磁力搅拌器	上海梅颖浦仪器仪表制造公司
其他仪器同第一部分	

1.2 主要试剂

10×TAE	北京索莱宝公司
核酸染料	北京索莱宝公司
DNA Marker	赛文创新生物科技
5×DNA 上样缓冲液	北京索莱宝公司
琼脂糖	北京索莱宝公司
NEBuffer r3.1	New England Biolabs 公司
NEBuffer r2.1	New England Biolabs 公司
T4 DNA 连接酶	New England Biolabs 公司
BsmBI-v2	New England Biolabs 公司
感受态细胞 DH5 α	天根生化（北京）科技公司
质粒小提试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
DNA 胶回收试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
鼠抗 NLRP3 多克隆抗体	武汉 proteintech 公司
Caspase-1 p20	北京博奥森公司
Caspase-1	美国 Novus
ASC	正能生物
IL-18	Santa 公司
IL-1 β	MCE 公司
CoraLite488-山羊抗鼠 IgG	武汉 proteintech 公司
CoraLite488-山羊抗兔 IgG	武汉 proteintech 公司
CoraLite594-羊抗鼠 IgG	武汉 proteintech 公司
CoraLite594-羊抗兔 IgG	武汉 proteintech 公司
其他试剂同第一部分	

2. 实验方法

2.1 细胞培养

实验步骤同第一部分

2.2 细胞转染

实验步骤同第一部分

2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

总 RNA 的提取、RNA 浓度测定、RNA 逆转录成 cDNA、Realtime PCR 的实验步骤均同第一部分

NLRP3 的引物如下:

人源引物

NLRP3 前引物 5'-GATCTTCGCTGCGATCAACAG-3'

NLRP3 后引物 5'-CGTGCATTATCTGAACCCCAC-3'

鼠源引物

NLRP3 前引物 5'-CTGCGGACTGTCCCATCAAT-3'

NLRP3 后引物 5'-AGGTTGCAGAGCAGGTGCTT-3'

2.4 细胞免疫荧光染色

实验步骤同第一部分

2.5 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定

实验步骤同第一部分

2.6 AO/EB 双染

实验步骤同第一部分

2.7 CCK-8 细胞活性检测

实验步骤同第一部分

2.8 FLICA/PI 双染共聚焦

实验步骤同第一部分

2.9 流式细胞术检测 HK-2 细胞凋亡

实验步骤同第一部分

3.0 免疫组织化学检测

实验步骤同第一部分

3.1 Western Blot

实验步骤同第一部分

3.2 NLRP3-crispr 质粒的制备

(1) NLRP3-crispr 的 sgRNA 序列设计: NCBI 网站 (<https://www>.

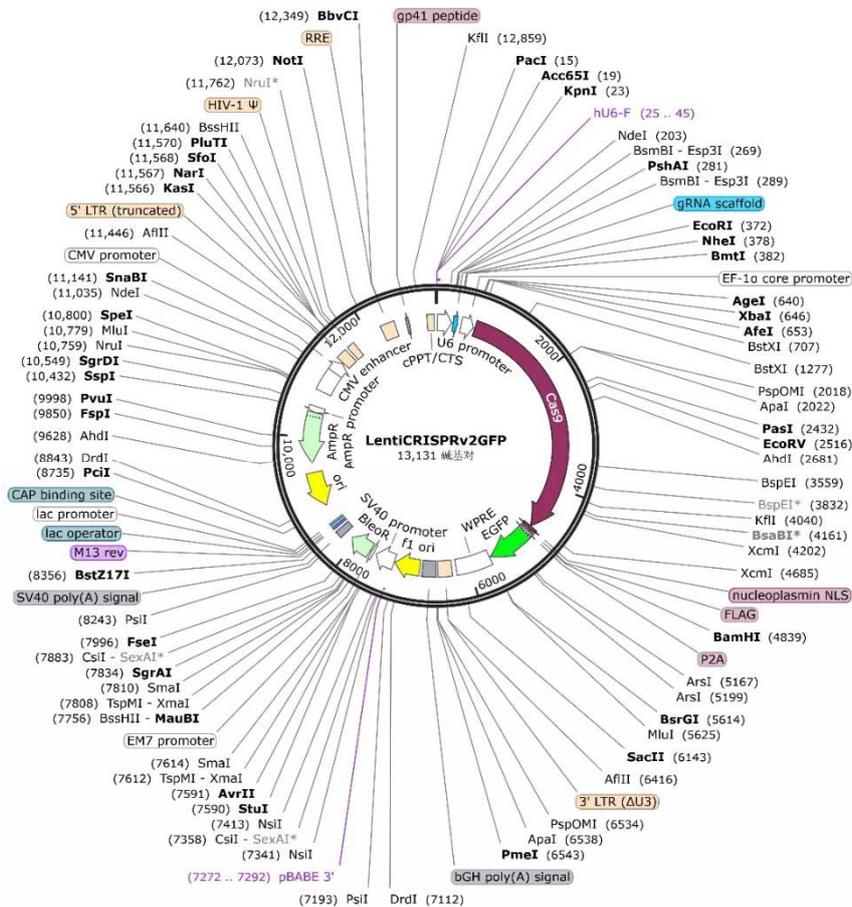
ncbi.nlm.nih.gov/)中查询人 NLRP3 基因的第二外显子序列,根据其在 zlab 网站 (<https://www.zlab.bio/resources>) 中设计它的 sgRNA (guide RNA) 序列,选取退火温度 (Tm) 在 56-62°C, GC 比例 40%-60%及没有二级结构的序列。然后分别在两条链 5'端,加上红色标注的序列。标红部分与经 BsmBI 限制性内切酶酶切后的载体互补 (BsmBI 的特点是酶切后不需要用 CIP 脱磷,也不会自连),最终的序列如下:

Forward: 5'- **CACCGT**GATTACGGGGCTATGACAT-3'

Reverse: 5'- **AAACAT**GTGCATAGCCCCGTAATCAC-3'.

(2) Crispr 质粒载体: CRISPR-Cas9 系统属于一种基因编辑技术,人工设计 sgRNA 序列识别目的基因组序列,并引导 Cas9 蛋白酶靶基因组进行定点切割,形成 DNA 的双链断裂。本研究选择 LentiCRISPRv2GFP 载体,长度为 13131bp,为 U6 启动子,含有氨苄霉素抗性基因及博来霉素筛选抗性。

质粒载体图谱如下:



①配制电泳缓冲液 1×TAE，称取适量琼脂糖 1%的琼脂糖溶解，微波炉加热熔化，待熔化的凝胶稍冷却加入荧光核酸染料，倒入安装好的水平电泳槽中插上样梳子凝固。

②待琼脂糖胶凝固后，在电泳槽内加入 1×TAE，电泳缓冲液面高出琼脂糖凝胶表面 1~2mm，拔出梳子。

③加样：将经过酶切的载体质粒 DNA 样品与 5×DNA loading buffer 4: 1 混匀，上样。其中上一个对照孔，上未酶切的 Crispr 空载体质粒，其余孔均为第（3）步的酶切产物，DNA marker 分别加至样品孔的左右两侧的两孔。

④电泳：盖上电泳槽，电压 135 V，电泳 30~40min。

⑤电泳结束，取出凝胶，置于紫外切胶仪中，观察 DNA 条带，不同大小的 DNA 分子由于迁移率的不同而分离。若未酶切的 Crispr 载体质粒孔条带电泳位置低于酶切产物条带，说明酶切成功。切下带有所需 DNA 片段的凝胶，置于 EP 管中称重，利用胶回收试剂盒将目的片段回收纯化。

（5）DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物 DNA

按照 omega DNA 胶回收试剂盒说明书，从琼脂糖凝胶中回收 DNA。

①根据 EP 管中琼脂糖凝胶的重量，加入等体积的 Binding Buffer（XP2），于 50-60°C 水浴锅中温浴 7min 或至凝胶完全熔化，每 2-3min 振荡或涡旋混合物。

②取一个 HiBind® DNA Mini 结合柱装在一个 2 mL 收集管内。将上步的熔胶液转移至结合柱中。室温 10,000 g 离心 1min。弃去收集管内液体，将柱子套回 2 mL 收集管内。

③300 μ L XP2 Binding Buffer 加至结合柱中，室温 13,000 g 离心 1min，弃滤液，将柱子套回 2mL 收集管内。

④将 700 μ L SPW Buffer（已用无水乙醇稀释）加至结合柱中，室温 10,000 g 离心 1min，弃滤液，将柱子套回 2 mL 收集管内。重复一次。

⑤室温下 13,000 g 离心 2min，目的是甩干结合柱残余液体。

⑥离心结束，结合柱装在一个新的 1.5 mL 离心管上，加入 15~30 μ L 的 Elution Buffer 到结合柱中心，室温放置 10min，13000 g 离心 1min 以洗脱 DNA。

（6）退火：配制体系如下：

表 1-9 退火体系

试剂	体积
NLRP3-sgRNA 序列前引物	10 μ L
NLRP3-sgRNA 序列后引物	10 μ L
NEBuffer r2.1	5 μ L
ddH2O	25 μ L

将体系置于 PCR 仪中, 设置程序: 90°C, 4min→70°C, 10min→40°C, 10min→25°C, 10min→4°C, ∞ 。结束后取出置于-20°C保存。

(7) 连接: 冰上配制连接体系:

表 1-10 连接体系

试剂	体积
退火产物 (稀释 100 倍)	2 μ L
DNA 回收产物	2 μ L
T4 DNA 连接酶	1 μ L
T4 Buffer	1 μ L
ddH2O	4 μ L

配好体系后, 室温放置 1h, PCR 仪中连接, 设置程序: 65°C, 10min→4°C, ∞ 。结束后取出连接产物-20°C保存。

(8) 转化

①冰上取 50 μ L 感受态细胞 DH5 α , 加入 5 μ L 上述连接产物, 冰浴 30 min, 然后置于 42°C水浴锅中 1 min (严格计时), 之后再冰浴 3min。加入 450 μ L 不含抗生素的 LB 液体培养基, 置于恒温摇床上, 37°C, 200 rpm, 1h。

②提前配制 LB 固体培养基并高压灭菌, 灭菌结束室温放置培养基不烫手后, 按照 1: 1000 比例加入氨苄霉素, 磁力搅拌器上转子混匀后倒入 10 cm 皿中, 静置冷却置于 4°C冰箱中保存待用(存放时间不要超过 1 周)。

③将①中摇好的菌液 5000 rpm 离心 2min, 弃上清至适量菌液均匀涂于固体 LB 培养基上, 倒置于 37°C恒温培养箱中过夜。

④12-14h 后挑取单克隆菌落, 放入含氨苄霉素的液体 LB 培养基中,

置于恒温摇床上, 37°C, 200 rpm, 12-14h。取部分菌液测序, 确定 sgRNA 与载体是否连接成功。

(9) 质粒提取:

按照 Omega 质粒提取试剂盒说明进行操作, 具体如下:

①将 RNase A 加入到 Solution I 中, 在 DNA Wash Buffer 中加入规定量的无水乙醇, 在 HBC Buffer 中加入规定量的异丙醇。

②室温下 5000 g 离心 10min 弃培养基, 收集菌体; 加入 500 μ L Solution I (含 RNaseA), 漩涡振荡上重悬细胞。

③将重悬液转移到新的 2 mL 离心管中, 加入 500 μ L Solution II, 温和颠倒混匀数次, 静置 2-3min。

④加入 700 μ L Solution III, 上下轻轻颠倒数次至形成白色絮状沉淀, 室温下 13,000 g 离心 10min。

⑤HiBind® DNA Mini 柱套入到 2 mL 收集管中, 每管分离柱中加入 700 μ L 上清液, 室温下 13,000 g 离心 1min, 弃滤液。

⑥将分离柱套回到 2 mL 收集管中, 加入 500 μ L HBC Buffer, 室温下 13,000 g 离心 1min, 弃滤液。

⑦将分离柱放回到收集管, 加入 700 μ L DNA Wash Buffer, 室温下 13,000 g 离心 1min, 弃滤液。重复一次。

⑧将分离柱放回到收集管, 13,000 g 离心空柱 2min。

⑨将分离柱放入新的 1.5 mL 离心管中, 加入 80~100 μ L Elution Buffer 到柱子基质中, 静置 2min, 13,000 g 离心 1min 洗脱出 DNA。使用 Nanodrop2000 分光光度计检测 DNA 纯度和浓度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$, $A_{260}/A_{230} > 2.0$ 的 DNA 较纯), -20°C 保存。

3.3 DDIT4 和 NLRP3 免疫荧光双染

(1) 按照需求制备细胞, 培养在细胞培养腔室载玻片中, 高糖诱导 48h;

(2) 弃去细胞中的培养基, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min;

(3) 弃去 PBS, 注意用移液器吸取干净, 加入甲醇室温固定 30min;

(4) 固定结束, 弃去甲醇, PBS 洗 3 次, 每次 10min;

(5) 打孔: 0.2% Triton X-100 打孔 20min, PBS 清洗 3 次, 每次 5min;

(6) 封闭: 5% BSA 室温封闭 30min;

(7) 封一抗: 选择二抗属性不同的抗体进行稀释 (DDIT4, 1:100; NLRP3,

- 1:200), 湿盒 4°C 封闭过夜;
- (8) 从 4°C 冰箱拿出, 室温复温 30min;
- (9) 回收一抗, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min;
- (10) 封荧光二抗 (DDIT4 对应兔二抗 1: 100; NLRP3 对应鼠二抗, 1: 100), 37°C 避光孵育 1h;
- (11) PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5min, 用含 DAPI 的防猝灭封片剂封片;
- (12) 湿盒晾干, 共聚焦荧光显微镜观察照相。

3.4 统计分析

统计方法同第一部分

结 果

2.1 高糖诱导下 DDIT4 对 NLRP3 炎症小体激活的影响

2.1.1 以 HK-2 细胞为研究对象, 检测在高糖诱导下, 敲低 DDIT4 对 NLRP3 炎症小体的影响。

(1) Realtime PCR 检测结果显示, 与 NG 组相比, 高糖诱导的 HK-2 细胞中, NLRP3 mRNA 同 DDIT4 一样表达升高; 相比 HG 组, 敲低 DDIT4 后, NLRP3 mRNA 表达下降, 差异具有统计学意义 (Fig.2-1)。

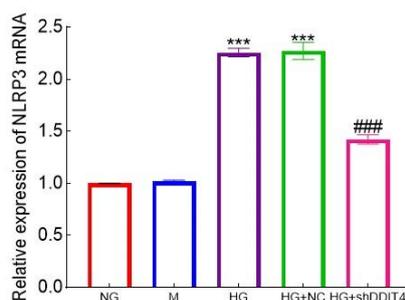


图 2-1 敲低 DDIT4 后 HK-2 细胞中 NLRP3 mRNA 的表达变化

Fig.2-1 The changes of NLRP3 mRNA after knocking down DDIT4 in HK-2

cells, *** $P < 0.001$, vs NG; ### $P < 0.001$, vs HG

(2) Western Blot 检测结果显示: 与 NG 组相比, 高糖诱导的 HK-2 细胞中, NLRP3 炎症小体各组分 NLRP3、ASC、Caspase-1 前体 (Pro-Caspase-1)、活化的 Caspase-1 (Caspase-1 p20) 以及细胞因子 IL-1 β

(precursor)、IL-1 β (mature) 和 IL-18 蛋白质表达水平均升高；相比 HG 组，敲低 DDIT4 后，除了 IL-1 β (precursor) 仅有表达下降的趋势外，上述其他蛋白表达均明显下降，差异具有统计学意义 (Fig.2-2)。

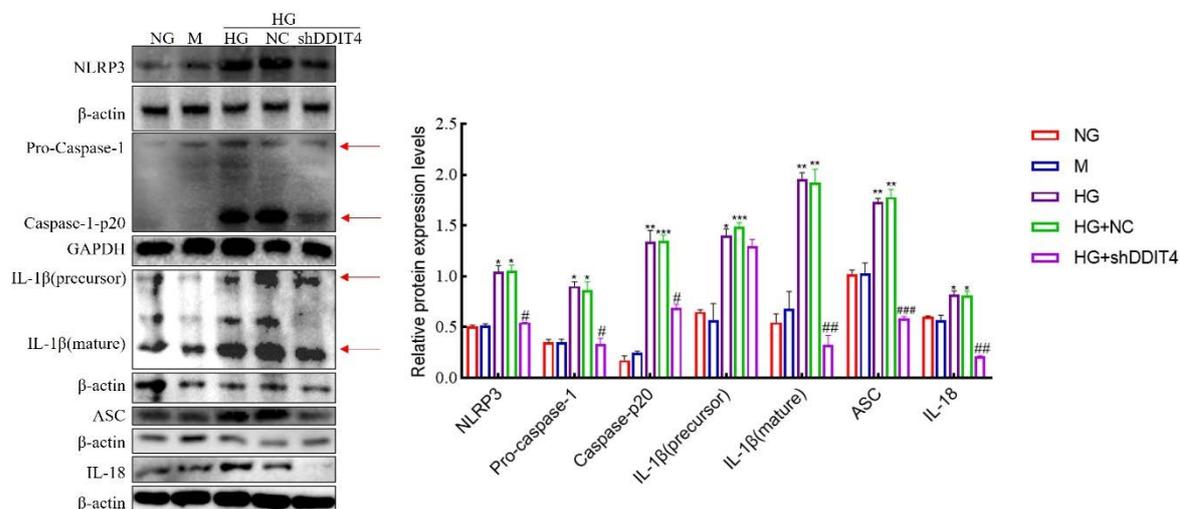


图 2-2 Western Blot 检测敲低 DDIT4 后 NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白的表达

Fig.2-2 Western Blot detection of NLRP3 inflammasome signaling pathway related protein expression after knocking down DDIT4

*/# $P < 0.05$, **/### $P < 0.01$, ***/#### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(3) 免疫荧光检测结果显示：与 NG 组相比，高糖诱导的 HK-2 细胞中，NLRP3 炎症小体关键组分 NLRP3 和 Caspase-1 染色增强；相比 HG 组，敲低 DDIT4 后，NLRP3 和 Caspase-1 染色减弱，差异具有统计学意义 (Fig.2-3)。

以上提示，高糖刺激的 HK-2 细胞中，敲低 DDIT4 能够抑制高糖引起的 NLRP3 炎症小体的激活。

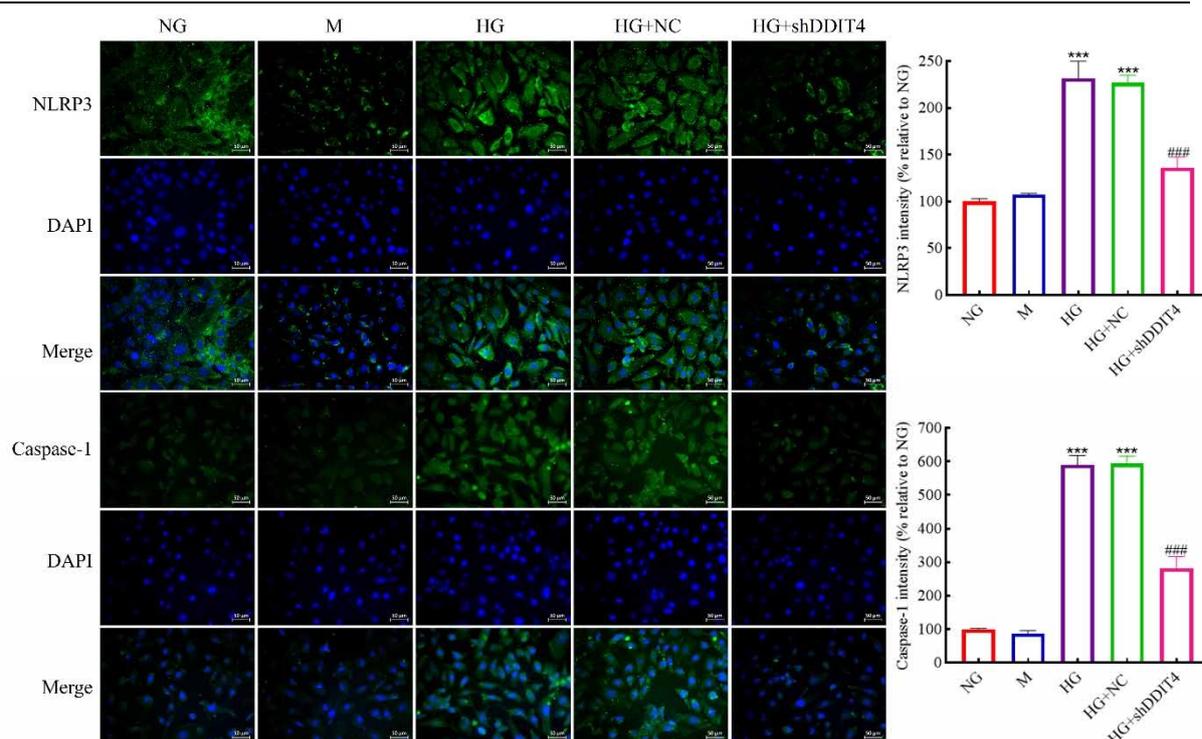


图 2-3 免疫荧光检测敲低 DDIT4 后 HK-2 细胞 NLRP3 和 Caspase-1 表达
 Fig.2-3 The expression of NLRP3 and Caspase-1 in HK-2 cells after knocking down DDIT4 detected by IF; ***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

2.1.2 以 HK-2 细胞为研究对象，检测在高糖诱导下，过表达 DDIT4 对 NLRP3 炎症小体的影响。

(1) Realtime PCR 检测结果显示：相比 HG 组，过表达 DDIT4 后，NLRP3 mRNA 表达上调，差异具有统计学意义 (Fig.2-4)。

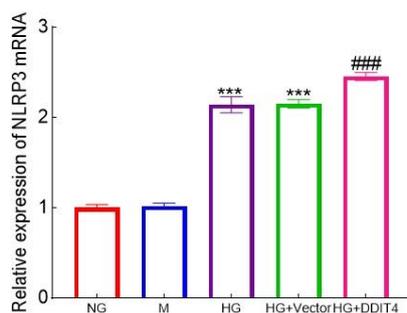


图 2-4 过表达 DDIT4 后 HK-2 细胞中 NLRP3 mRNA 的表达水平
 Fig.2-4 The expression level of NLRP3 mRNA after overexpressing DDIT4 in HK-2 cells, ***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG

(2) Western Blot 检测结果显示: 与 HG 组相比, 过表达 DDIT4 的 HK-2 细胞中, NLRP3 炎症小体各组分 NLRP3、ASC、Caspase-1 前体(Pro-Caspase-1)、活化的 Caspase-1 (Caspase-1 p20) 以及细胞因子 IL-1 β (precursor)、IL-1 β (mature) 和 IL-18 蛋白质水平表达均明显上调, 差异具有统计学意义 (Fig.2-5)。

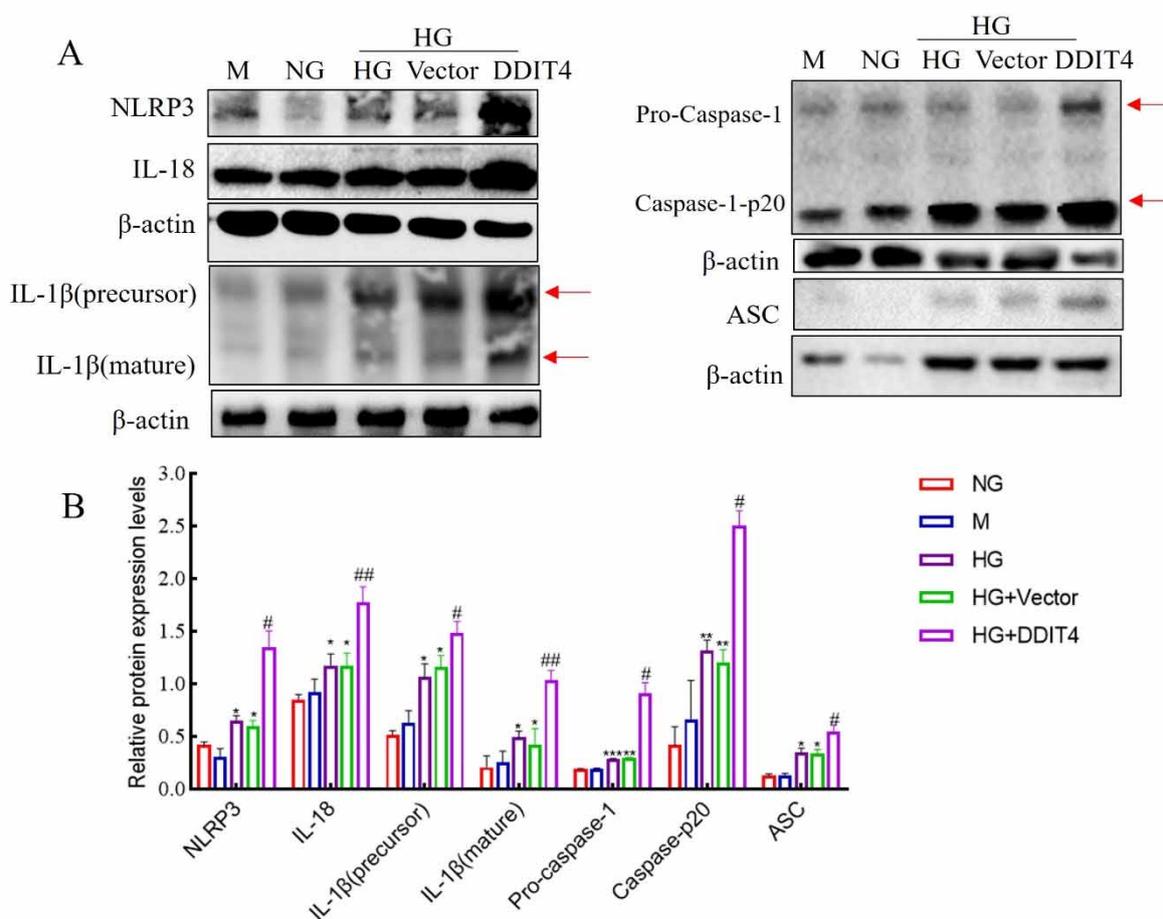


图 2-5 Western Blot 检测过表达 DDIT4 后 NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白的表达

Fig.2-5 Western Blot detection of NLRP3 inflammasome signaling pathway related protein expressions after overexpressing DDIT4

*/# $P < 0.05$, **/### $P < 0.01$; * vs NG, #vs HG;

(3) 免疫荧光检测结果显示: 与 HG 组相比, 过表达 DDIT4 的 HK-2 细胞中, NLRP3 炎症小体关键组分 NLRP3 和 Caspase-1 染色增强, 差异具有统计学意义 (Fig.2-6)。

以上提示, 高糖诱导的 HK-2 细胞中, 过表达 DDIT4 能够进一步加

强高糖引起的 NLRP3 炎症小体的激活。

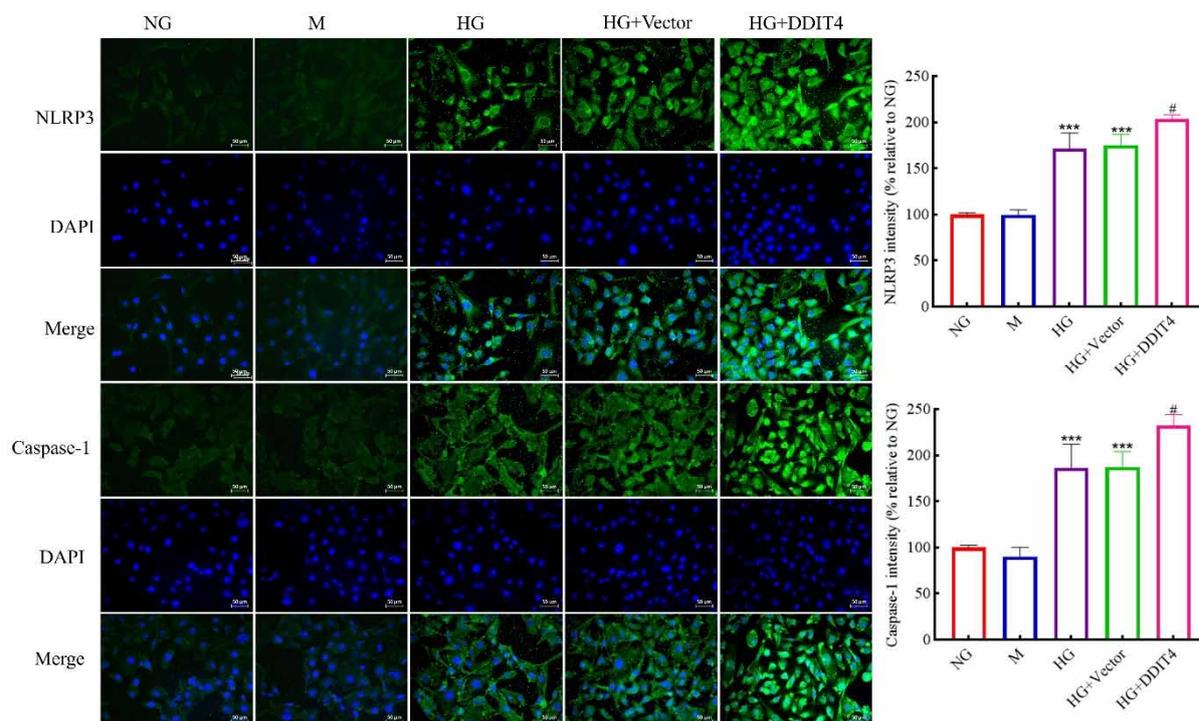


图 2-6 免疫荧光检测过表达 DDIT4 后 HK-2 细胞 NLRP3 和 Caspase-1 的表达变化

Fig.2-6 The expression of NLRP3 and Caspase-1 in HK-2 cells after overexpressing DDIT4 detected by IF, # $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; * vs NG, #vs HG

2.1.3 以 STZ 诱导的糖尿病小鼠为研究对象，检测敲除 DDIT4 对小鼠肾脏 NLRP3 炎症小体的影响

(1) Western Blot 实验结果显示：与 WT 组小鼠相比，DKO 组小鼠肾脏组织中 NLRP3 炎症小体各组分 NLRP3、ASC、Caspase-1 前体 (Pro-Caspase-1)、活化的 Caspase-1 (Caspase-1 p20) 以及细胞因子 IL-1 β (precursor)、IL-1 β (mature) 和 IL-18 蛋白质表达水平下降，而 STZ-WT 组中这些蛋白质明显上调。相比 STZ-WT 组小鼠，敲除 DDIT4 的 STZ 诱导的糖尿病小鼠 (STZ-DKO 组) 肾脏组织中，上述蛋白质表达下降，差异有统计学意义 (Fig.2-7)。

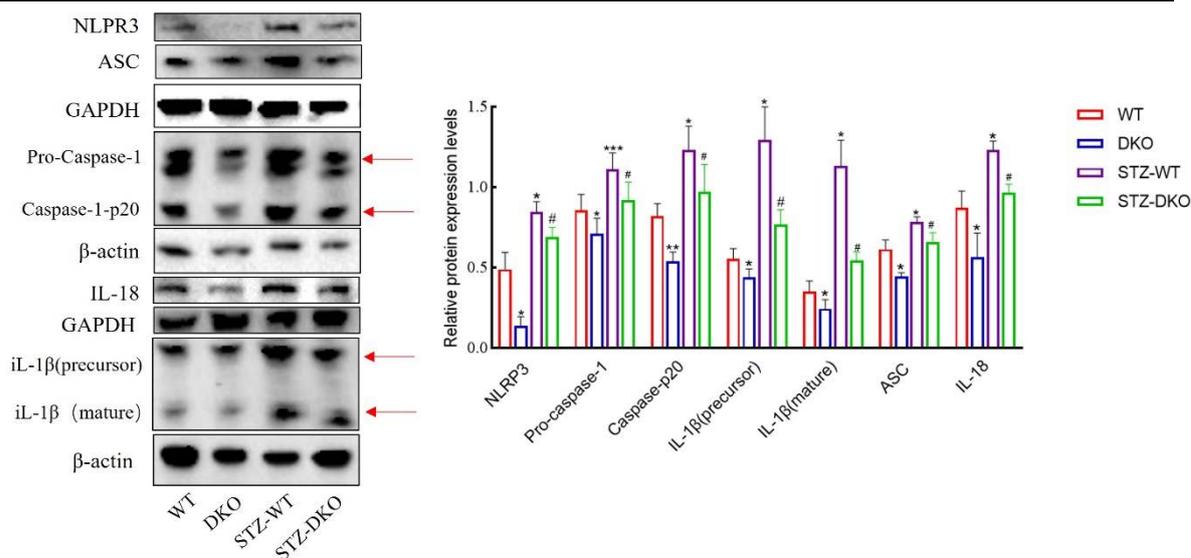


图 2-7 Western Blot 检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏组织中 NLPR3 炎症小体相关蛋白的表达

Fig.2-7 The expression of NLPR3 Inflammasome related proteins in the kidney of STZ-induced diabetes mice detected by Western Blot

*/# $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; * vs WT, # vs STZ-WT

(2) 免疫组化检测结果显示: 与 WT 组小鼠相比, DKO 组小鼠肾脏组织中 NLPR3 和 Caspase-1 蛋白质表达水平下降, 而 STZ-WT 组中这些蛋白质明显上调。相比 STZ-WT 组小鼠, STZ-DKO 组小鼠肾脏组织中, 上述蛋白质表达下降 (Fig.2-8)。

以上均提示: STZ 诱导的糖尿病小鼠中, 敲除 DDIT4 能够抑制肾脏组织 NLPR3 炎症小体的激活。

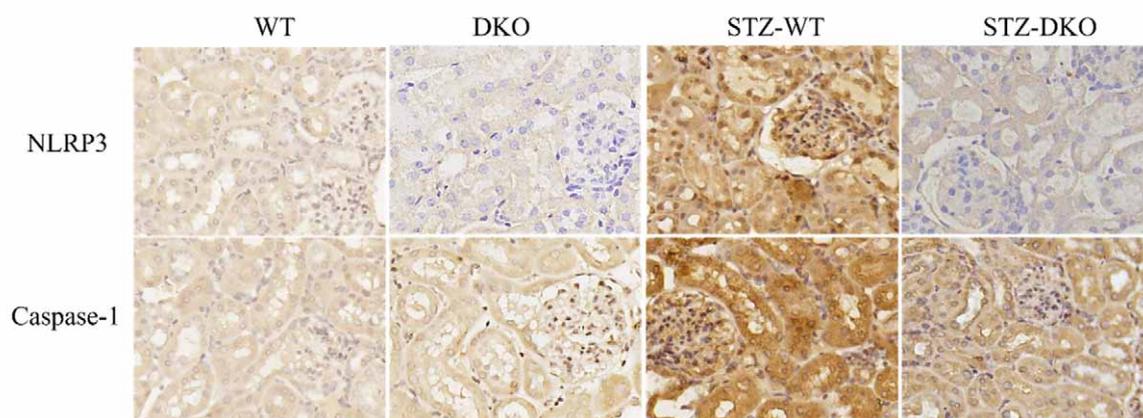


图 2-8 免疫组化检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏组织中 NLRP3 和 Caspase-1 表达水平

Fig.2-8 The protein expression of NLRP3 and Caspase-1 in renal tissue of STZ-induced diabetes mice detected by IHC

2.1.4 以 db/db 糖尿病小鼠为研究对象，检测敲低 DDIT4 对小鼠肾脏 NLRP3 炎症小体的影响

(1) Western Blot 实验结果显示：与 db/m 组小鼠相比，db/db 组和 db/db-control 组小鼠肾脏组织中 NLRP3 炎症小体各组分 NLRP3、ASC、Caspase-1 前体 (Pro-Caspase-1)、活化的 Caspase-1 (Caspase-1 p20) 以及细胞因子 IL-1 β (precursor mature) 和 IL-18 蛋白质表达水平明显上调。相比 db/db 组小鼠，敲低 DDIT4 的 db/db 糖尿病小鼠 (db/db-shDDIT4 组) 肾脏组织中，除 Pro-Caspase-1 和 IL-1 β (precursor) 仅有下降趋势外，其余蛋白质表达均下降，差异有统计学意义 (Fig.2-9)。

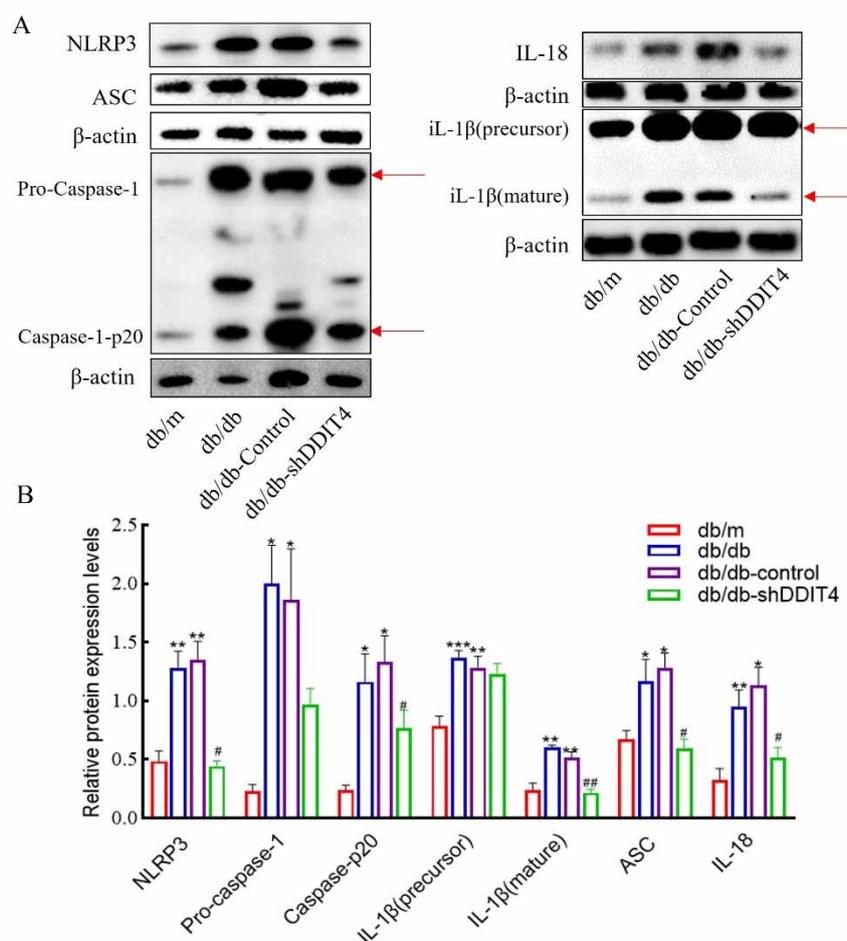


图 2-9 Western Blot 检测 db/db 糖尿病小鼠肾脏组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达

Fig.2-9 The expression of NLRP3 Inflammasome related proteins in the kidney of db/db diabetes mice detected by Western Blot

*/# $P < 0.05$, **/## $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; * vs WT, # vs STZ-WT

(2) 免疫组化检测结果显示：与 db/m 组小鼠相比，db/db 组和 db/db-control 组小鼠肾脏组织 NLRP3 炎症小体关键组分 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白质表达水平明显上调。相比，db/db 组小鼠，db/db-shDDIT4 组小鼠肾脏组织中 (Fig.2-10)。

以上均提示：db/db 糖尿病小鼠中，敲低 DDIT4 能够抑制肾脏组织 NLRP3 炎症小体的激活。

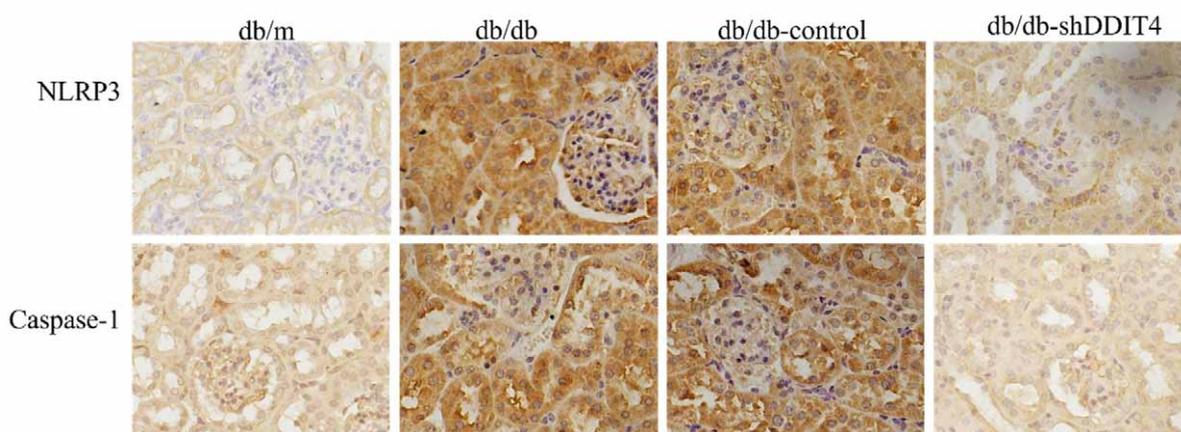


图 2-10 免疫组化检测 2 型糖尿病小鼠肾脏组织中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平

Fig.2-10 The protein expression of NLRP3 and Caspase-1 in type 2 diabetes mice detected by IHC

2.2 免疫荧光共聚焦检测 DDIT4 和 NLRP3 共定位情况

为了进一步确定 DDIT4 和 NLRP3 的协同关系，应用免疫荧光共定位检测两者在肾小管上皮细胞中的定位情况。结果显示：与 NG、M 组相比，HG 组 DDIT4 和 NLRP3 的荧光染色强度增加，过表达 DDIT4 后，两者表达更强，敲低 DDIT4 后，随之下降。另外，NG 和 M 组 HK-2 细胞中，DDIT4 和 NLRP3 有少量的共定位，高糖刺激下，尤其是过表达 DDIT4 后共定位情况明显，敲低 DDIT4 后，共定位不明显。提示：高糖环境下，DDIT4 介导的肾小管上皮细胞损伤，与 NLRP3 存在协同关系(Fig.2-11)。

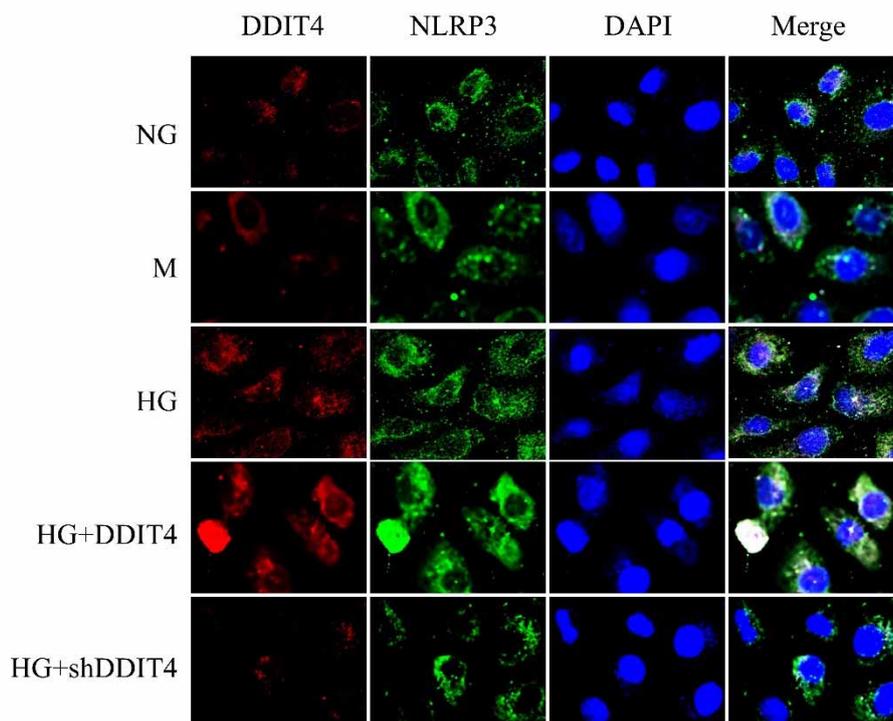


图 2-11 DDIT4 和 NLRP3 免疫荧光共定位 (×200)

Fig.2-11 The colocalization of DDIT4 and NLRP3(×200)

2.3 以 HK-2 细胞为研究对象，检测高糖诱导下，过表达 DDIT4 的同时敲低 NLRP3，肾小管细胞焦亡及纤维化指标的变化

2.3.1 NLRP3-crispr 质粒载体的构建与敲低效率的验证

(1) 验证 NLRP3-crispr 质粒载体的成功构建

将构建的 NLRP3-crispr 质粒进行测序，用 SnapGene 软件进行比对，比对结果显示，NLRP3-crispr 质粒构建成功 (Fig.2-12)。



图 2-12 NLRP3-crispr 质粒测序结果比对

Fig.2-12 The Comparison results of NLRP3-crispr plasmid sequencing

(2) 验证 HK-2 细胞转染 NLRP3-crispr 的敲低效率

Realtime PCR 和 Western Blot 结果显示，高糖诱导的 HK-2 细胞中，瞬时转染 NLRP3-crispr 质粒，NLRP3 的表达明显减弱 (Fig.2-13)。

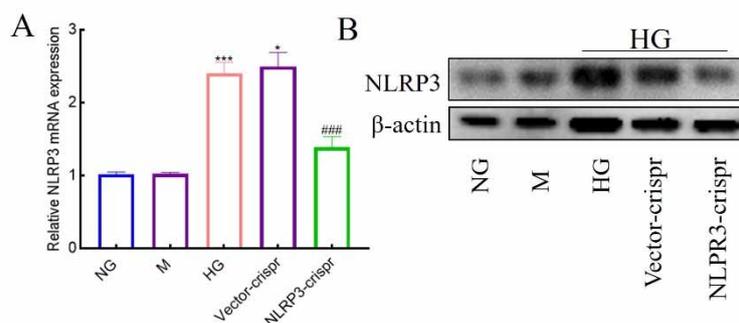


图 2-13 Realtime PCR 和 Western Blot 检测 NLRP3 的敲低效率

Fig.2-13 The knockdown efficiency of NLRP3 detected by realtime PCR and Western Blot, * $P < 0.05$, ***/### $P < 0.001$, *vs NG; #vs HG

2.3.2 高糖环境下，HK-2 细胞中同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒后，肾小管上皮细胞焦亡和纤维化指标的变化

(3) AO/EB 染色检测细胞膜完整性变化结果显示：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞橘红色荧光染色减少。结果提示：敲低 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞膜完整性的受损程度 (Fig.2-14)。

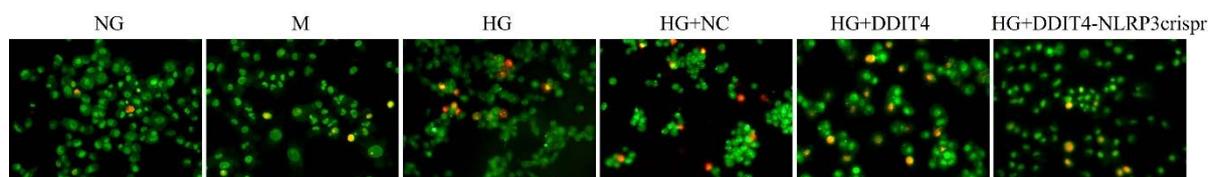


图 2-14 AO/EB 染色检法检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 HK-2 细胞膜完整性 (×200)

Fig.2-14 The cell membrane integrity of HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under high glucose stimulation detected by AO/EB staining assay (×200)

(5) LDH 活性检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞，释放的 LDH 明显减少，差异具有统计学意义 ($p < 0.001$)。提示：敲低 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞的细胞膜破裂 (Fig.2-15)。

(6) CCK-8 细胞活力检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞的细胞活力明显减弱，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示：敲低 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞活力的降低。(Fig.2-15)

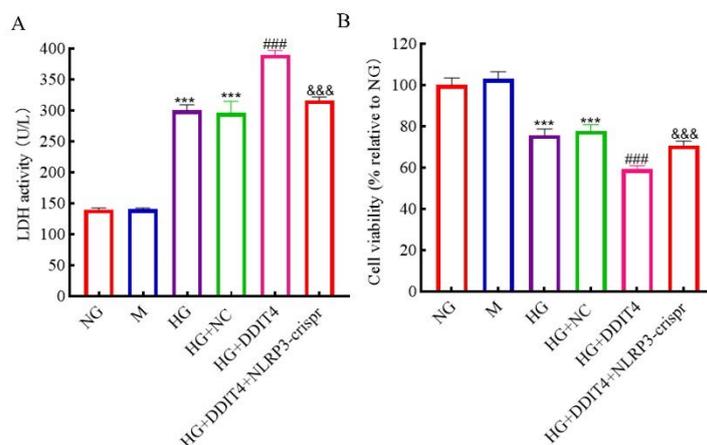


图 2-15 高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 HK-2 细胞乳酸脱氢酶活性和细胞活力的变化

Fig.2-15 The LDH activity and cell viability of HK-2 with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected

***/### $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG, & vs HG+DDIT4

(7) EDU 细胞增殖活性检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞增殖活性明显减少，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示：敲低 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞增殖活性的降低 (Fig.2-16)。

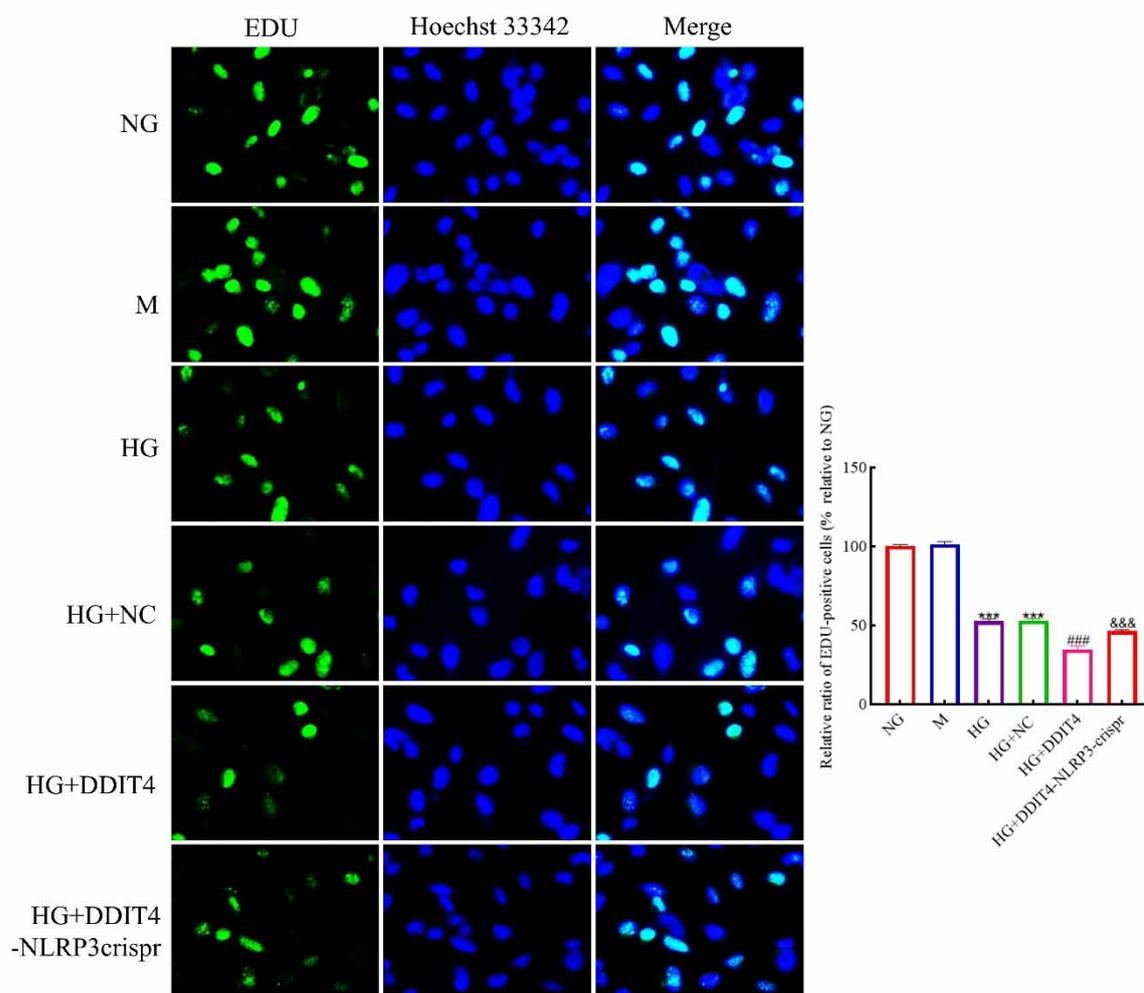


图 2-16 高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 EDU 实验检测 HK-2 细胞增殖活性 (×200)

Fig.2-16 The proliferation viability of HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by EDU (×200), ***/###/∞∞∞ $P<0.001$, *vs NG, #vs HG, &vs HG+DDIT4

(8) 免疫荧光共聚焦分析 FLICA 和 PI 双染:与 DDIT4 过表达组相比,同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞中 FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性细胞显著减少,差异具有统计学意义 ($P<0.001$) (Fig.2-17)。

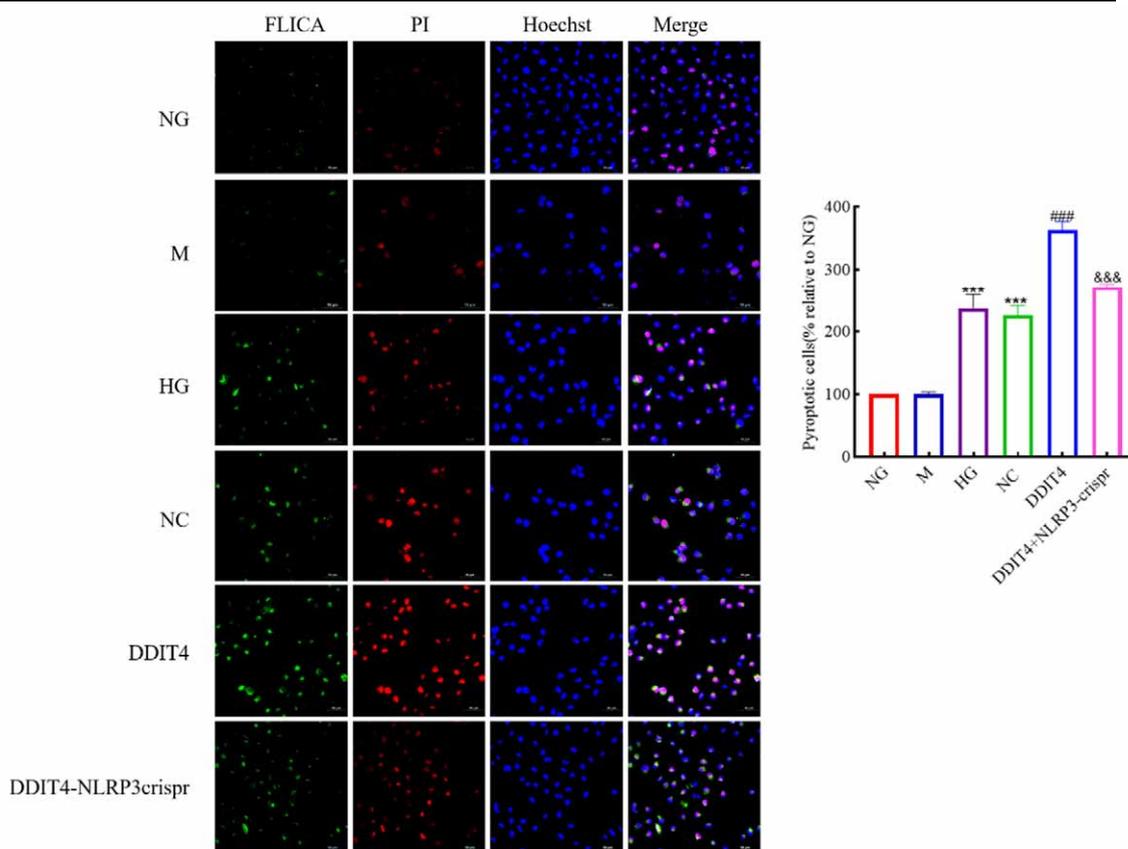


图 2-17 高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后免疫荧光共聚焦检测 HK-2 细胞焦亡情况 (×200)

Fig.2-17 The cell pyroptosis in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by Immunofluorescence confocal (×200)

***/###/∞∞∞ $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG, & vs DDIT4

(9) Western Blot 检测结果显示: 与 DDIT4 过表达组相比, 同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞中, 焦亡执行蛋白 GSDMD 的全长和活性片段 (GSDMD-FL 和 GSDMD-N)、NLRP3、Caspase-1 前体和活性剪切片段 (pro-Caspase-1 和 Caspase-1)、ASC、IL-1 β (precursor)、IL-1 β (mature), 以及纤维化指标蛋白 (Collagen Type I 和 FN1) 表达水平均明显下降, 差异具有统计学意义 (Fig.2-18)。

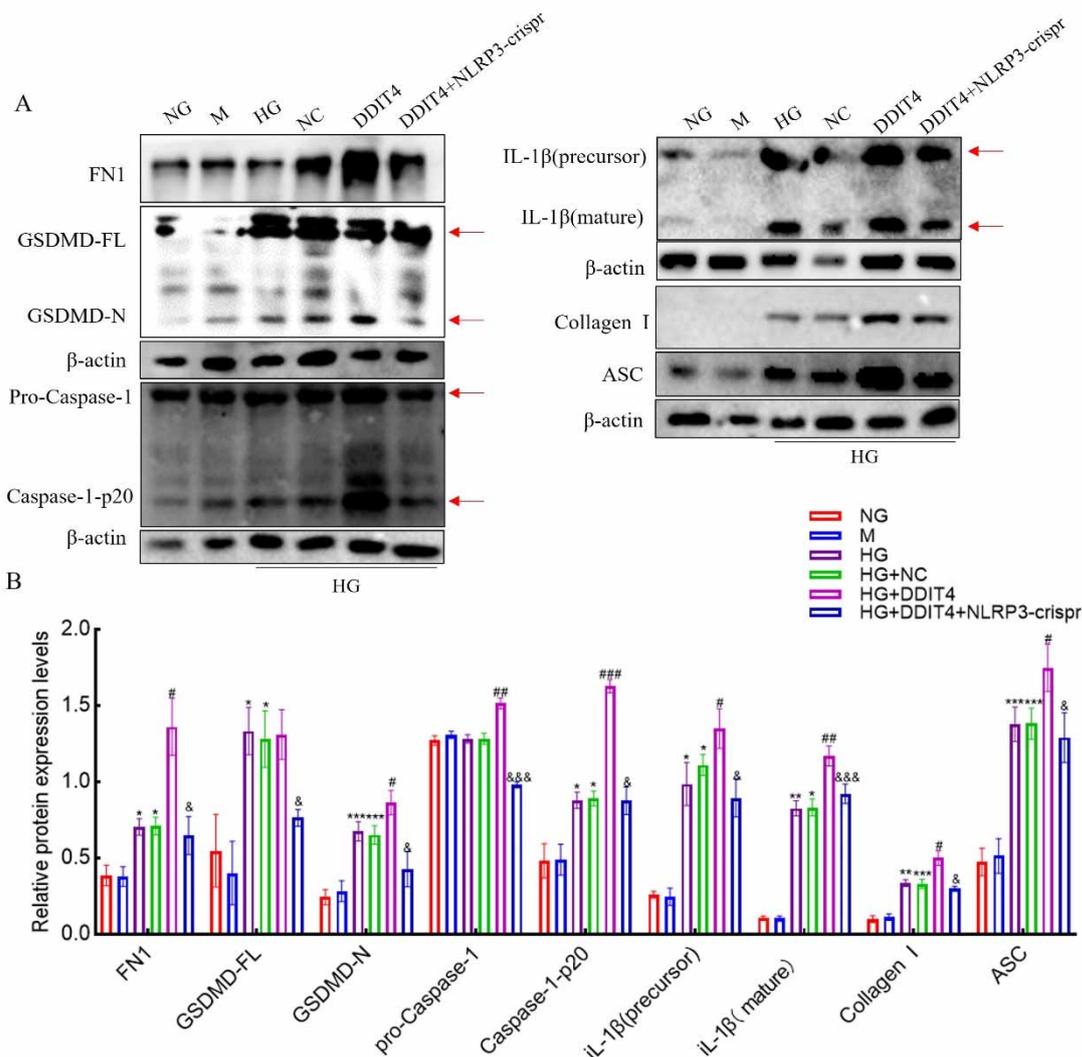


图 2-18 高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 Western Blot 检测 HK-2 细胞焦亡和纤维化相关蛋白表达情况

Fig.2-18 The expression of proteins related to pyroptosis and fibrosis in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by Western blot

*#/#&P<0.05, **/##P<0.01, ***/###/&&&P<0.001; *vs NG, #vs HG, &vs HG+DDIT4

(10) 免疫荧光检测结果显示：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 NLRP3-crispr 质粒的 HK-2 细胞中，除 DDIT4 染色变化不大，焦亡执行蛋白 GSDMD、NLRP3、Caspase-1 以及纤维化指标蛋白（Collagen I 和 FN1）的 HK-2 细胞中染色强度明显下降，差异具有统计学意义（Fig.2-19-Fig.2-24）。

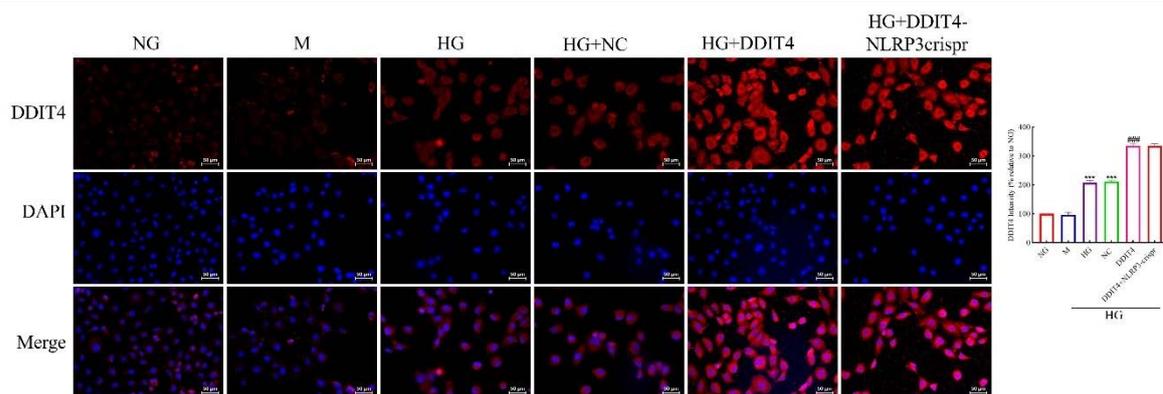


图 2-19 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 DDIT4 的表达情况

Fig.2-19 The expression of DDIT4 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, $***/###P<0.001$; * vs NG, #vs HG

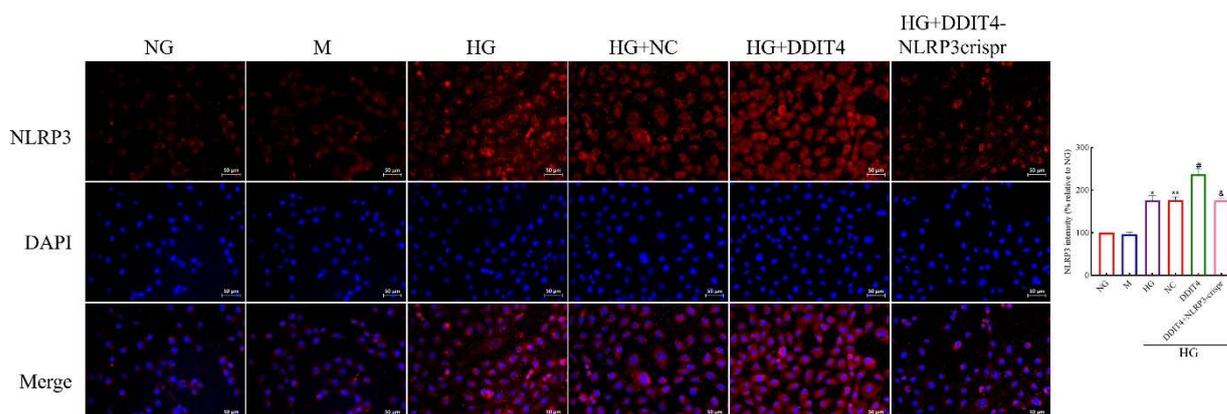


图 2-20 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 NLRP3 的表达情况

Fig.2-20 The expression of NLRP3 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, $*/#/ & P<0.05$, $** P<0.01$; * vs NG, #vs HG, & vs HG+DDIT4

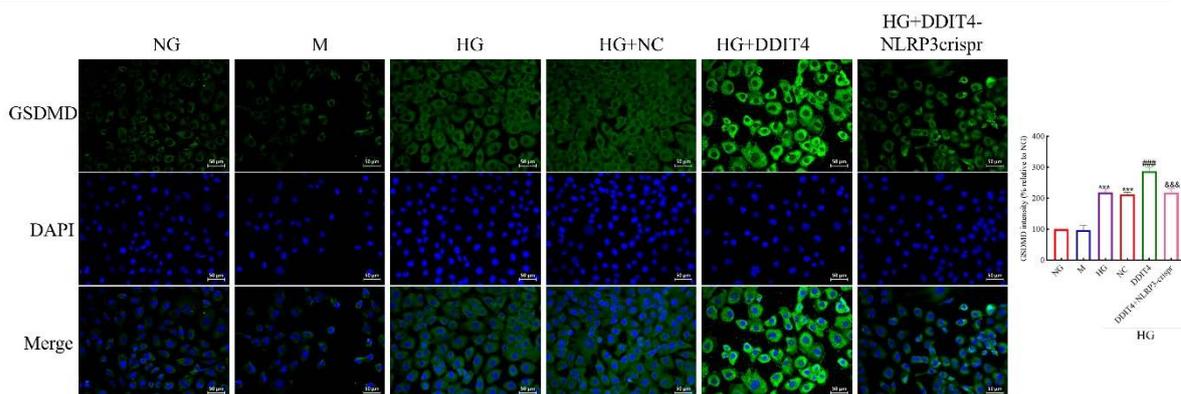


图 2-21 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 GSDMD 的表达情况

Fig.2-21 The expression of GSDMD protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, ^{***}/^{###} $P < 0.001$; ^{*} vs NG, [#] vs HG, [&] vs HG+DDIT4

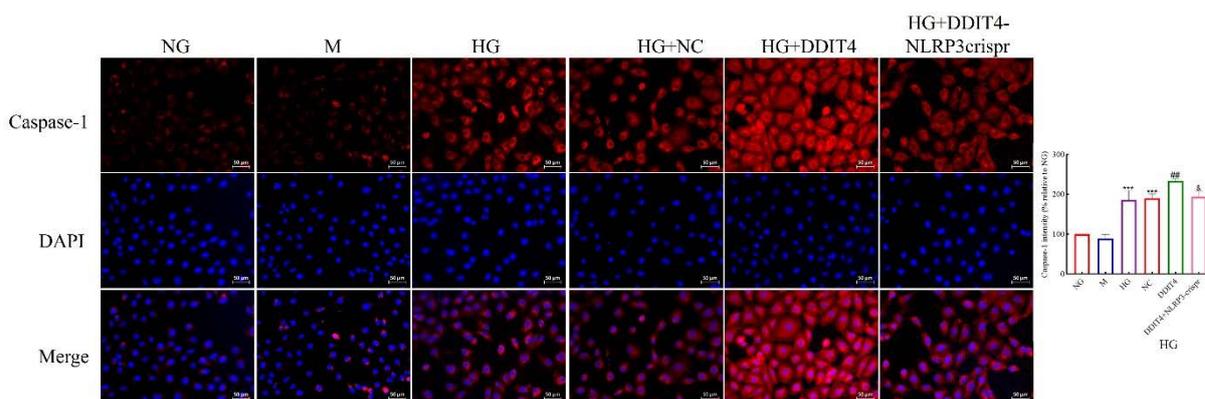


图 2-22 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 Caspase-1 的表达情况

Fig.2-22 The expression of Caspase-1 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, [&] $P < 0.05$, vs HG+DDIT4; ^{##} $P < 0.01$, vs HG; ^{***} $P < 0.001$, vs NG

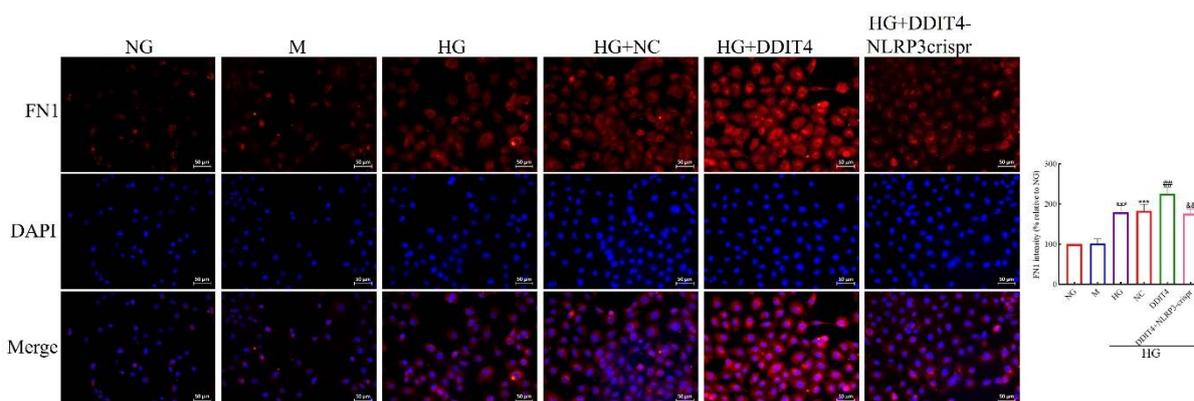


图 2-23 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 FN1 的表达情况

Fig.2-23 The expression of FN1 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, ###&&P<0.01; ***P<0.001; *vs NG, #vs HG, &vs HG+DDIT4

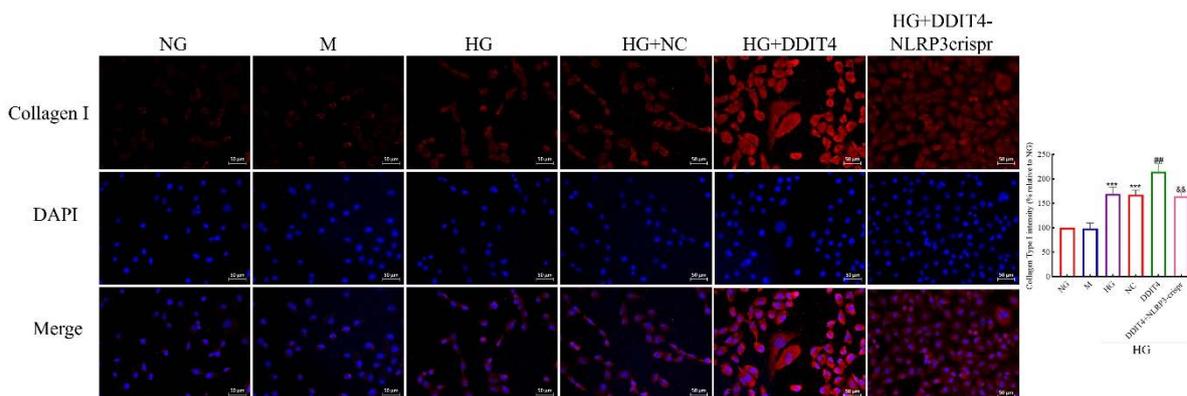


图 2-24 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时敲低 NLRP3 后 Collagen I 的表达情况

Fig.2-24 The expression of Collagen I protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 knockdown under glucose stimulation detected by IF, ###&&P<0.01; ***P<0.001; *vs NG, #vs HG, &vs HG+DDIT4

2.4 以 HK-2 细胞为研究对象，检测高糖诱导下，过表达 DDIT4 的同时加入 NLRP3 抑制剂，检测肾小管细胞焦亡及纤维化指标的变化

(1) AO/EB 染色检测细胞膜完整性变化结果显示：与 DDIT4 过表达组相比，同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 (10μM) 的 HK-2 细胞橘红色荧光染色减少。结果提示：抑制 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞膜完整性的受损程度 (Fig.2-25)。

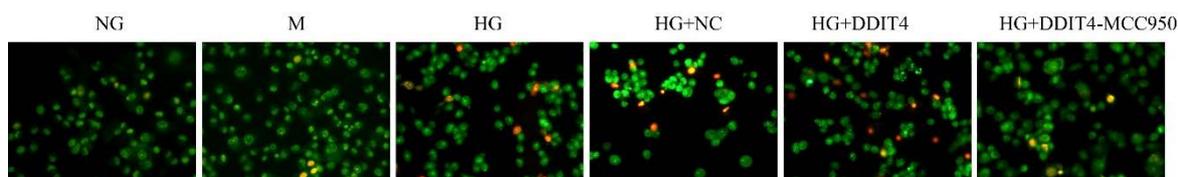


图 2-25 AO/EB 染色检法检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 HK-2 细胞膜完整性 (×200)

Fig.2-25 The cell membrane integrity of HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under high glucose stimulation detected by AO/EB staining assay ($\times 200$)

(2) LDH 活性检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞释放的 LDH 明显减少，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示：抑制 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞的细胞膜破裂 (Fig.2-26)。

(3) CCK-8 细胞活力检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞活力明显减弱，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示：抑制 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞活力的降低 (Fig.2-26)。

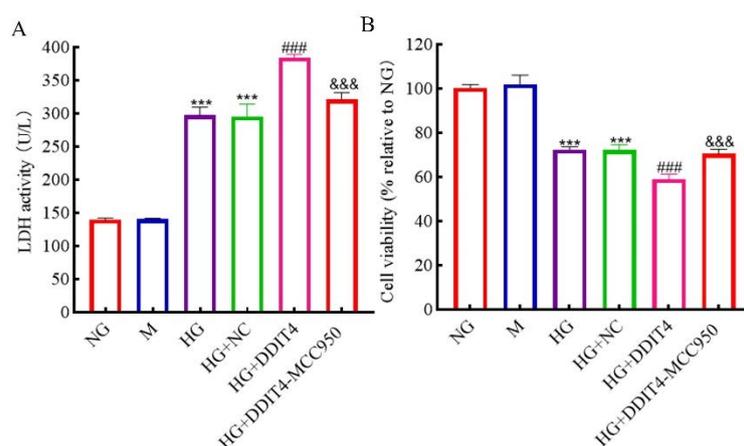


图 2-26 高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 HK-2 细胞乳酸脱氢酶活性和细胞活力

Fig.2-26 The LDH activity and cell viability of HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation

***/###/&&& $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG, & vs HG+DDIT4

(7) EDU 细胞增殖活性检测：与 DDIT4 过表达组相比，同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞的增殖活性明显减少，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示：抑制 NLRP3 能够有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达引起的肾小管上皮细胞增殖活性的降低 (Fig.2-27)。

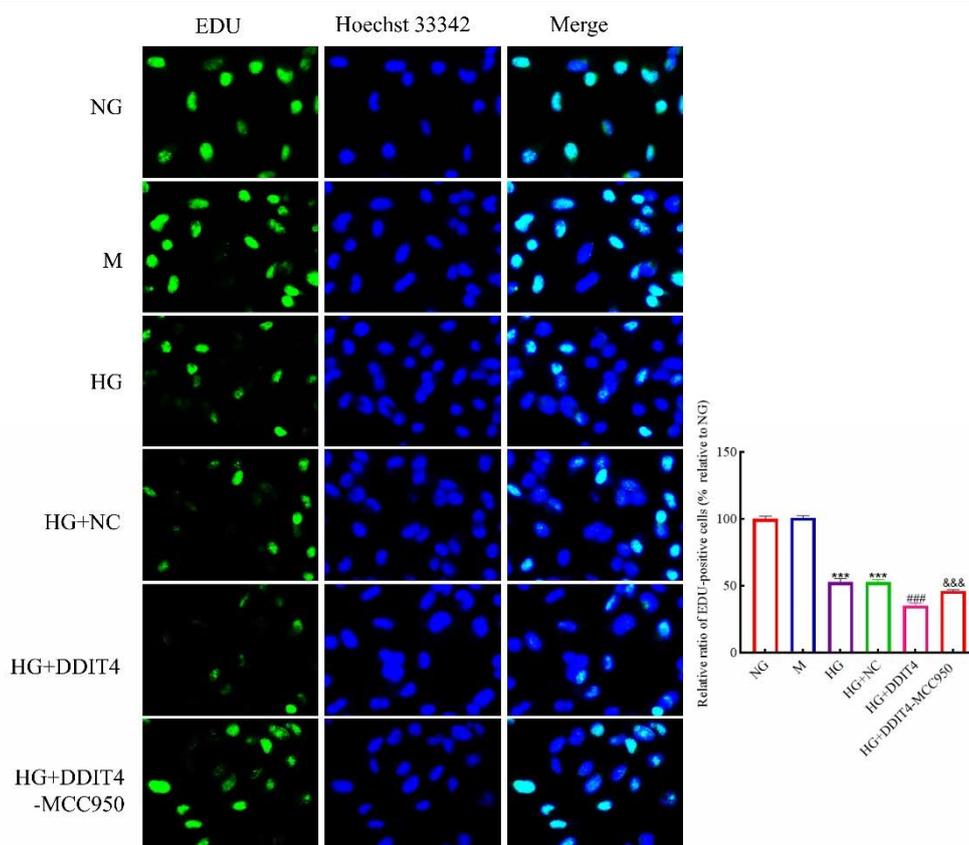


图 2-27 高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 EDU 实验检测 HK-2 细胞的增殖活性 ($\times 200$)

Fig.2-27 The cell proliferation viability of HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by EDU ($\times 200$), $***/###/ \&\&\& P < 0.001$; * vs NG, # vs HG, & vs HG+DDIT4

(8) 免疫荧光共聚焦分析 FLICA 和 PI 双染: 与 DDIT4 过表达组相比,同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞中 FAM-YVAD-FMK 和 PI 双阳性细胞显著减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (Fig.2-28)。

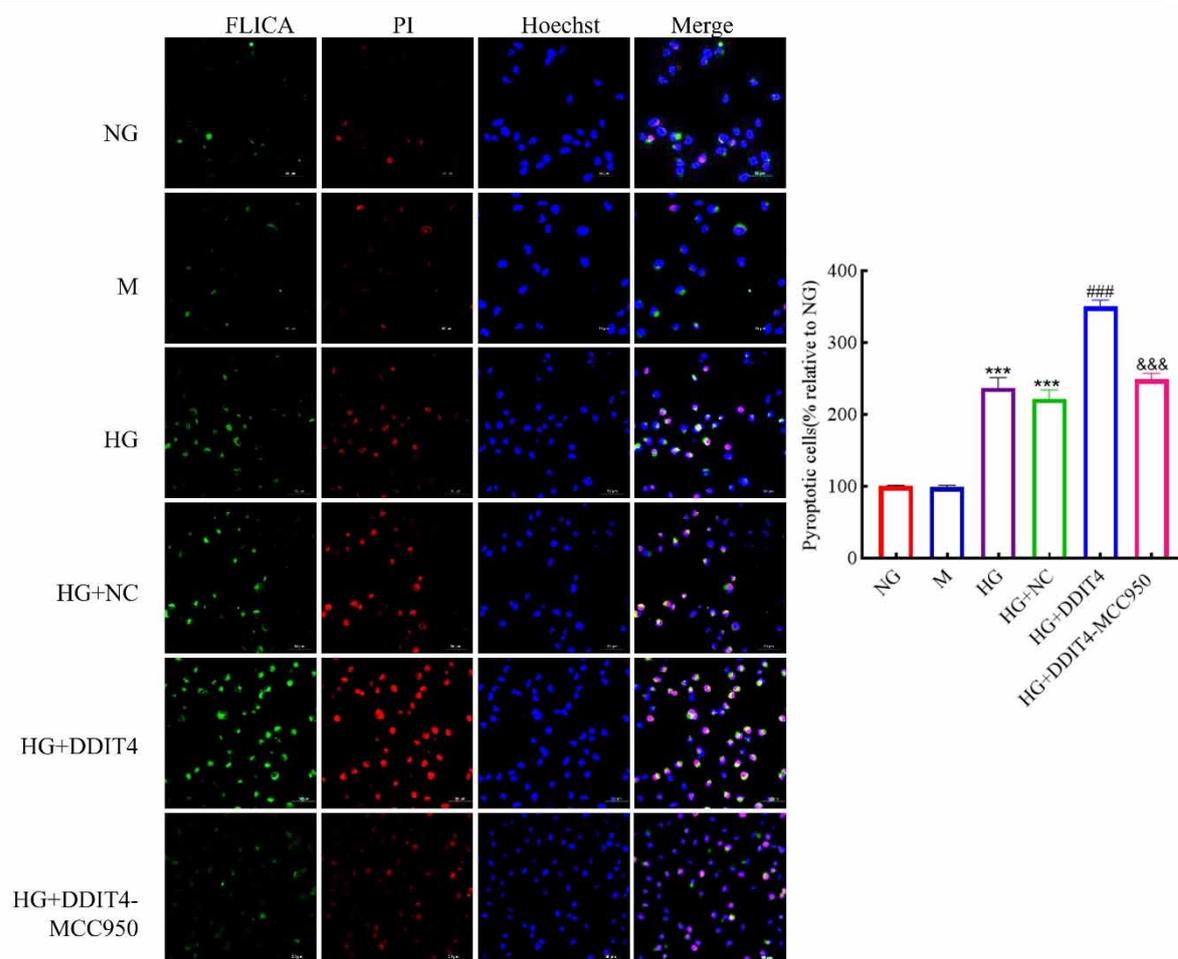


图 2-28 高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后免疫荧光共聚焦检测 HK-2 细胞焦亡情况 (×200)

Fig.2-28 The cell pyroptosis in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by Immunofluorescence confocal (×200)

***/###/ &&& $P < 0.001$; * vs NG, # vs HG, & vs HG+DDIT4

(9) Western Blot 检测结果显示: 与 DDIT4 过表达组相比, 同时加入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞中, 除了 GSDMD-FL 仅有下降趋势外, GSDMD-N、NLRP3、Caspase-1 前体和活性剪切片段 (pro-Caspase-1 和 Caspase-1)、ASC、IL-1 β (precursor)、IL-1 β (mature), 以及纤维化指标蛋白 (Collagen I 和 FN1) 表达水平均明显下降, 差异具有统计学意义 (Fig.2-29)。

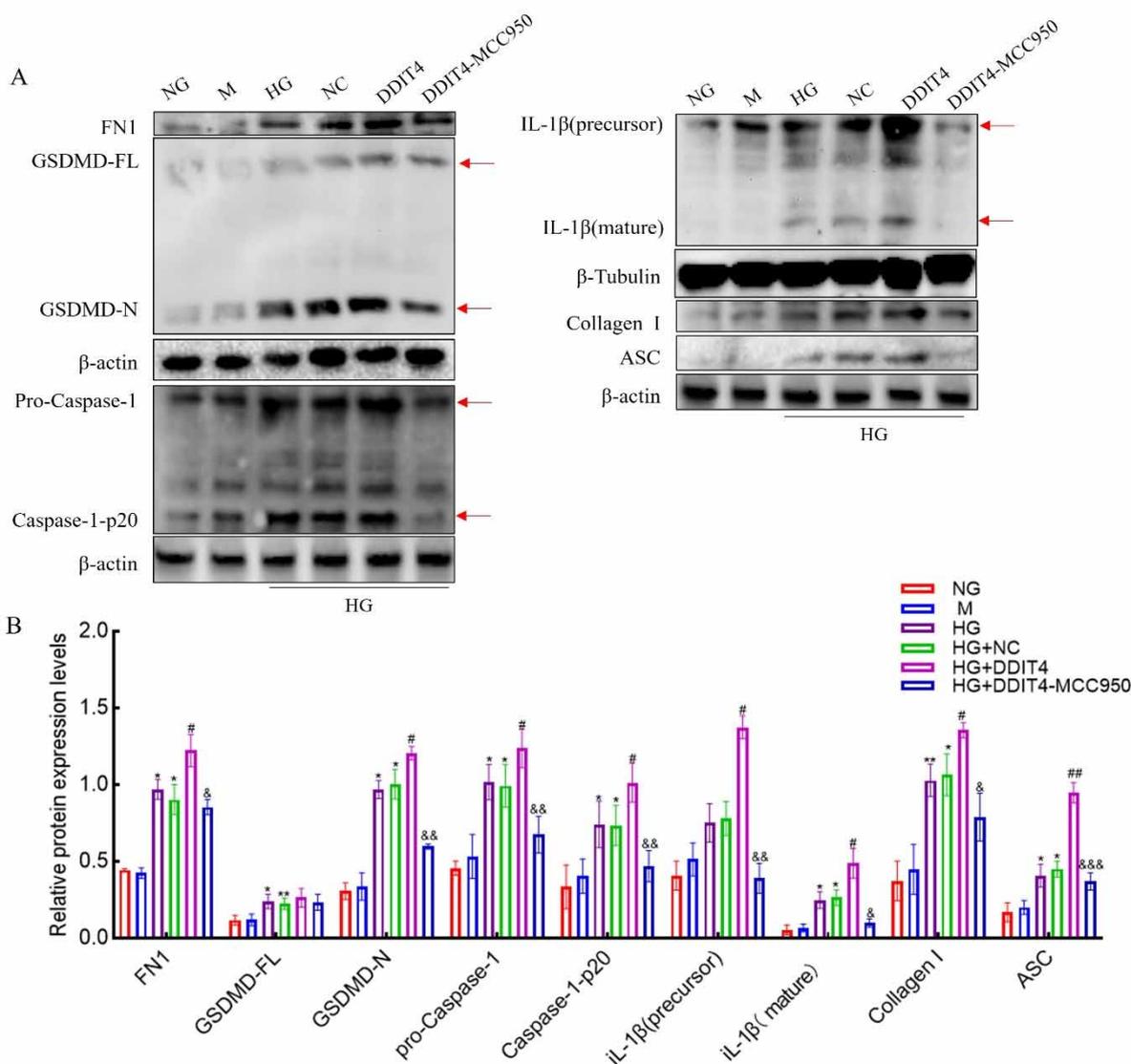


图 2-29 高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 Western Blot 检测 HK-2 细胞焦亡、炎症、纤维化相关蛋白表达情况

Fig.2-29 The expression of proteins related to apoptosis, inflammation and fibrosis in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by Western bolt

*#/#&P<0.05, **/###/##&&P<0.01, &&&P<0.001; * vs NG, # vs HG, & vs HG+DDIT4

(10) 免疫荧光检测结果显示：与 DDIT4 过表达组相比，同时转入 DDIT4 过表达质粒和 MCC950 的 HK-2 细胞中，除 DDIT4 染色变化不大，焦亡执行蛋白 GSDMD、NLRP3、Caspase-1 以及纤维化指标蛋白(Collagen I 和 FN1)的 HK-2 细胞中染色强度明显下降，差异具有统计学意义(Fig.2-30-Fig.2-35)。

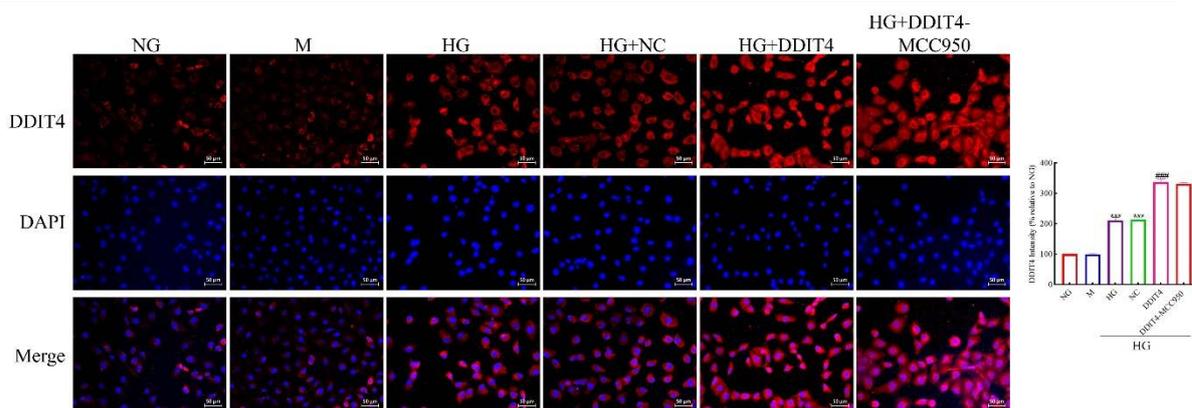


图 2-30 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 DDIT4 的表达情况

Fig.2-30 The expression of DDIT4 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by IF, $***/###P<0.001$; * vs NG, #vs HG

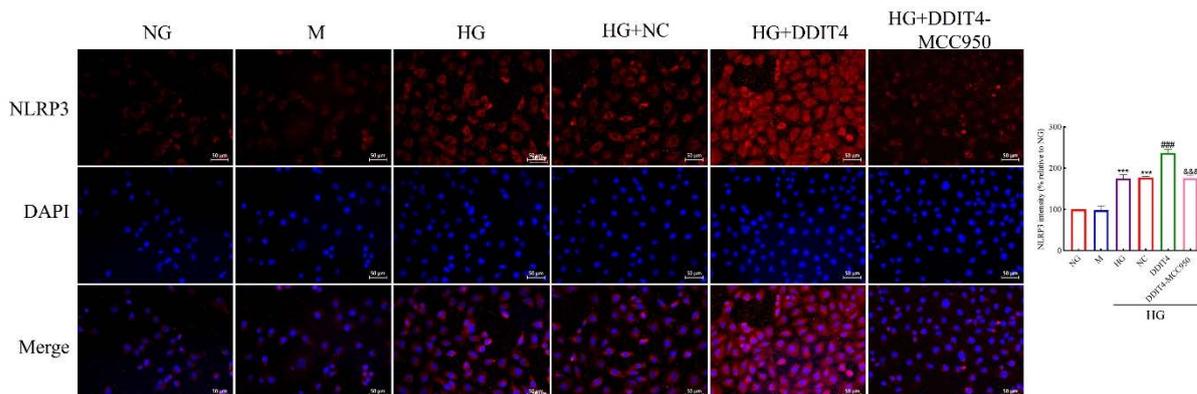


图 2-31 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 NLRP3 的表达情况

Fig.2-31 The expression of NLRP3 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by IF, $***/###/###P<0.001$; * vs NG, #vs HG, &vs HG+DDIT4

图 2-34 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 FN1 的表达情况

Fig.2-34 The expression of FN1 protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by IF, $***P<0.001$; $*vs\ NG$, $\#vs\ HG$, $\&vs\ HG+DDIT4$

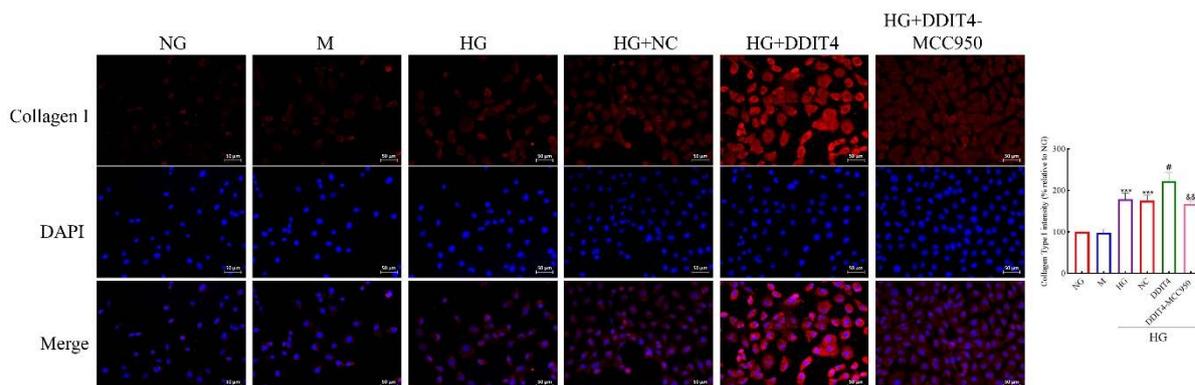


图 2-35 免疫荧光检测高糖条件下过表达 DDIT4 同时抑制 NLRP3 后 Collagen I 的表达情况

Fig.2-35 The expression of Collagen I protein in HK-2 cells with both DDIT4 overexpression and NLRP3 inhibition under glucose stimulation detected by IF, $\#P<0.05$, $\&&P<0.01$, $***P<0.001$; $*vs\ NG$, $\#vs\ HG$, $\&vs\ HG+DDIT4$

讨 论

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症之一，是一种由代谢紊乱引发的炎症性疾病，持续高血糖环境引起的炎症级联反应在肾损伤和纤维化的加重中起着不可或缺的作用。炎症，更具体地说，促炎细胞因子和其他在炎症过程中发挥相关作用的分子，可能是微血管糖尿病并发症（包括肾病）发展的关键因素^[12]。慢性炎症是 DN 的特征，通常是纤维化过程的诱因^[13, 14]。肾脏纤维化是肾脏功能丧失的结构基础，也是各种肾脏疾病进展至肾衰竭的共同途径。肾纤维化伴随着细胞外基质（ECM）蛋白的过度积累，如肾小球和肾小管间质中的纤连蛋白（FN1）和各种胶原蛋白^[15, 16]。无论病因如何，肾纤维化都是一个慢性和进行性过程，会导

致 DN 期间肾功能下降^[1,17]。其中炎症在进行性肾纤维化中起核心作用之一。

NLRP3 炎症小体在肾脏疾病中的病理作用引起了广泛关注^[18]。NLRP3 炎症小体的激活不仅导致炎症反应，而且诱导一种细胞焦亡^[19]。焦亡可分为经典途径和非经典途径，NLRP3 炎症小体是最重要的引发剂。NLRP3 炎症小体介导的焦亡是其主要的激活机制之一，也是激活炎症反应的关键步骤。当 NLRP3 炎症小体被激活时，它将非活性的 pro-Caspase-1 转化为活性的 Caspase-1，随后促进成熟 IL-1 β 和 IL-18 的产生并裂解 GSDMD。GSDMD 的 N-末端片段导致膜孔的形成并诱导焦亡^[20]。同时，NLRP3 炎症小体的激活可导致大量炎症因子的产生，这是包括 DN 在内的许多炎症性疾病的发病机制^[21]。

多项研究已经证明，NLRP3 炎症小体成分的表达与肾脏炎症和纤维化密切相关。NLRP3 炎症小体激活在糖尿病肾脏中得到证实，NLRP3 或 Caspase-1 缺乏可改善糖尿病肾损伤^[22]。更有研究已经证实糖尿病肾病的小管细胞中，存在 NLRP3 炎症小体激活和 NLRP3 依赖性的细胞焦亡发生^[23]。此外，本团队前期研究成果显示 NLRP3 缺乏可以改善糖尿病小鼠的肾脏炎症和纤维化^[9]。

目前，关于 DDIT4 调控 NLRP3 炎症小体的研究甚少。仅发现一项研究，在 DDIT4 缺失小鼠中，骨髓源性巨噬细胞（BMDM）和脂肪组织在 LPS 刺激下，NLRP3 炎症小体的激活和 IL-1 β 的产分泌减弱。这提示了 DDIT4 对 NLRP3 的潜在的调控作用。除本团队外，目前尚未发现关于 DDIT4 与 NLRP3 在糖尿病肾病的相关研究。本部分实验发现，在高糖环境下，HK-2 细胞中干预 DDIT4 后，NLRP3 炎症小体各组分及激活后分泌的 IL-1 β 和 IL-18 发生了相应的改变。另外，1 型糖尿病小鼠肾脏组织中敲除 DDIT4，或者 2 型糖尿病小鼠肾脏组织中敲低 DDIT4，高糖引起的 NLRP3 炎症小体各组分以及 IL-1 β 和 IL-18 的表达升高得到有效控制。表明在高糖刺激下，DDIT4 在糖尿病肾病中作用是通过调控 NLRP3 炎症小体来实现的。

NLRP3 是 NLRs 蛋白家族的成员，也是 NLRP3 炎症小体的核心分子之一。除此之外，免疫荧光共定位实验，检测到 DDIT4 和 NLRP3 在 HK-2 细胞中存在，提示了 DDIT4 和 NLRP3 协同调控的可能性，这需要更多

的实验来证明。

Crispr-Cas9 基因编辑技术是一种新的方法,已成为世界上应用最广泛的基因组编辑技术。利用这项技术,有可能操纵细胞的基因组^[24]。本部分还利用 Crisp-Cas9 基因编辑技术构建了 NLRP3-crispr 质粒,该技术的优点是可以较为稳定进行基因干预。高糖培养下的 HK-2 细胞,过表达 DDIT4 的同时转入 NLRP3-crispr 质粒,通过细胞活力,培养上清中 LDH 含量、细胞增殖活性、活性 Caspase-1 和 PI 双染等实验,以及 Caspase-1, GSDMD, ASC, IL-1beta, IL-18 的蛋白表达水平检测均提示细胞焦亡被有效抑制。同时肾小管上皮细胞中纤维化蛋白 FN1 和 Collagen Type I 的表达也被显著抑制。说明 NLRP3 的有效干预,可以有效缓解高糖环境下 DDIT4 高表达导致的肾小管损伤。

另外,本研究还选择了 MCC950(CP-456773),一种有效选择性的 NLRP3 抑制剂,可特异性阻断 NLRP3 依赖性焦亡程序性细胞死亡^[25]。MCC950 是最有前途的抑制剂之一,特异性阻断 NLRP3,从而阻断 IL-1 β 和 IL-18 的激活,已经在临床开发中^[25, 26]。在一项使用 2 型糖尿病 db/db 模型的 DN 预防性研究中, MCC950 已被证明具有肾脏保护作用^[27]。本团队前期研究也已证实, MCC950 治疗可以有效改善 db/db 小鼠肾小球内脂质沉积,以及减少高糖引起的 HK-2 的细胞凋亡和线粒体 ROS 的产生等^[28]。本部分研究通过在高糖培养下的 HK-2 细胞中,过表达 DDIT4 的同时加入 MCC950,有效抑制了 NLRP3 炎症小体的激活、细胞焦亡的发生、纤维化的加重。

综上所述, DDIT4 可以通过上调 NLRP3 炎症小体的激活调控糖尿病肾病状态下的肾小管细胞焦亡及纤维化反应。

小 结

1. 糖尿病肾病时, DDIT4 介导了 NLRP3 炎症小体的激活。
2. 抑制 NLRP3 能够有效缓解 DDIT4 高表达引起的高糖诱导下的肾小管细胞焦亡及纤维化反应。

1. Miao H, Wu XQ, Wang YN, et al. 1-Hydroxypyrene mediates renal fibrosis through aryl hydrocarbon receptor signalling pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(1):103-124.
2. Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1).
3. Wang S, Yuan YH, Chen NH, et al. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67:458-464.
4. Zheng Z, Li G. Mechanisms and Therapeutic Regulation of Pyroptosis in Inflammatory Diseases and Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4).
5. Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, et al. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3):2116-2132.
6. Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis[J]. *Nature*, 2014, 512(7512):69-73.
7. Lin J, Cheng A, Cheng K, et al. New Insights into the Mechanisms of Pyroptosis and Implications for Diabetic Kidney Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19).
8. Han Y, Xu X, Tang C, et al. Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis[J]. *Redox Biol*, 2018, 16:32-46.
9. Wu M, Han W, Song S, et al. NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 478:115-125.
10. Song S, Qiu D, Luo F, et al. Knockdown of NLRP3 alleviates high glucose or TGFB1-induced EMT in human renal tubular cells[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61(3):101-113.

11. Pastor F, Dumas K, Barthélémy MA, et al. Implication of REDD1 in the activation of inflammatory pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):7023.
12. Ram C, Gairola S, Verma S, et al. Biochanin A Ameliorates Nephropathy in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects on NF- κ B/NLRP3 Axis, Pyroptosis, and Fibrosis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5).
13. Jin L, Yu B, Armando I, et al. Mitochondrial DNA-Mediated Inflammation in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:9985603.
14. Grynberg K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2017, 8:829.
15. Zhao X, Kwan J, Yip K, et al. Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(1):57-75.
16. Ren LL, Miao H, Wang YN, et al. TGF- β as A Master Regulator of Aging-Associated Tissue Fibrosis[J]. *Aging Dis*, 2023, 14(5):1633-1650.
17. Miao H, Cao G, Wu XQ, et al. Identification of endogenous 1-aminopyrene as a novel mediator of progressive chronic kidney disease via aryl hydrocarbon receptor activation[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(15):3415-3435.
18. Xiang H, Zhu F, Xu Z, et al. Role of Inflammasomes in Kidney Diseases via Both Canonical and Non-canonical Pathways[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:106.
19. Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9):2114-2127.
20. Wang L, Hauenstein AV. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76:100889.
21. Qiu YY, Tang LQ. Roles of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114:251-264.
22. Shahzad K, Bock F, Dong W, et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2015, 87(1):74-84.

23. Wang Y, Ding L, Wang R, et al. Circ_0004951 Promotes Pyroptosis of Renal Tubular Cells via the NLRP3 Inflammasome in Diabetic Kidney Disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9:828240.
24. Vaghari-Tabari M, Hassanpour P, Sadeghsoltani F, et al. CRISPR/Cas9 gene editing: a new approach for overcoming drug resistance in cancer[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1):49.
25. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3):248-255.
26. Coll RC, Hill JR, Day CJ, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6):556-559.
27. Zhang C, Zhu X, Li L, et al. A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12:1297-1309.
28. Wu M, Yang Z, Zhang C, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome ameliorates podocyte damage by suppressing lipid accumulation in diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 2021, 118:154748.

第三部分

DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 在糖尿病肾病中的作用和相关性

前 言

DDIT4 是一种应激诱导和代谢相关蛋白，前两部分研究已经明确 DDIT4 在高糖环境下培养的肾小管上皮细胞以及 1/2 型糖尿病小鼠中的表达及作用。但是在临床糖尿病肾病患者肾脏组织中的表达及作用，以及与 NLRP3 和 GSDMD 的相关性并未见相关性报道。

另外，作为一种炎症和免疫相关疾病，糖尿病肾病肾组织中的免疫细胞，包括驻留和浸润的免疫相关细胞，在 DN 的发生和发展中起着至关重要的作用。从实验和临床研究中积累的证据表明，肾脏炎症在决定糖尿病期间肾损伤是否进展方面发挥着关键作用。越来越多的研究表明，DN 患者的肾组织中存在大量巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞^[1]，它们分泌大量炎症介质、细胞因子和氧自由基，可直接或间接诱导肾组织损伤，加速肾纤维化进程。有研究表明，无关原发性病变，肾小管间质损伤的严重程度和间质白细胞浸润的程度与肾功能丧失和进展为终末期肾病的风险最相关^[2-4]。白细胞浸润在慢性肾脏疾病中介导肾小管间质炎症和纤维化中起主要作用。作为糖尿病肾脏中主要的浸润性白细胞之一，巨噬细胞与 DN 患者肾功能下降有关^[5]。巨噬细胞的聚集与肾小球硬化、蛋白尿、Scr 和肾间质纤维化的程度之间存在高度相关性^[6]。特别是，表达 C-C 趋化因子受体 2 型（CCR2）的巨噬细胞的积累促进了肾小球肾炎和糖尿病肾病等疾病中的肾损伤和纤维化重塑^[7]。CCR2 在单核细胞、髓样前体细胞和 T 细胞、树突状细胞和多种组织实质细胞上表达^[8, 9]。有研究发现 GSDMD 介导的肝细胞焦亡，可通过上调 CCR2 来扩大加重急性肝功能衰竭的炎症反应，提示了 GSDMD 与 CCR2 存在调控关系^[10]。但是关于 DDIT4/NLRP3/GSDMD/ CCR2 在糖尿病肾病中的表达、作用及相关性并未见报道。

本部分主要是从 GEO 公共数据库、糖尿病肾病患者的临床肾穿刺标

医科大学第二医院伦理委员会批准且取得患者本人知情同意。

2.3 HE 染色

- 1) 烤片步骤和免疫组织化学步骤相同;
- 2) 将切片依次浸入: 二甲苯 I 缸 10min→二甲苯 II 缸 10min→二甲苯 III 缸 10min→无水乙醇 5min→95%酒精 5min→75%酒精 5min→自来水冲洗。
- 3) 复染: 苏木素染液染 3min, 自来水洗 60s;
- 4) 分化: 1%盐酸酒精中分化 30s, 自来水洗 60s;
- 5) 反蓝: 1%氨水中返蓝 2min, 自来水洗 60s;
- 6) 脱水: 伊红染液染 2min, 75%乙醇 5min→85%乙醇 5min→无水乙醇 5min→二甲苯 I 缸 5min→二甲苯 II 缸 5min。晾干, 滴加中性树胶封片。晾干待显微镜观察。

2.4 Masson

方法同第一部分

2.4 PAS

方法同第一部分

2.5 免疫组织化学

方法同第一部分

2.6 统计分析

实验数据使用 GraphPad prism 8 软件进行统计分析, 使用 χ^2 或 t 检验或 *Mann-Whitney U* 检验检验两组之间的差异。两个指标的相关性使用 Pearson (两组均符合正态分布) 或者 spearman (至少一组不符合正态分布) 分析。受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线的绘制使用 MedCalc 软件, $P < 0.05$ 表示存在统计学差异。

结 果

1. GEO 数据集糖尿病肾病和对照组样本 DDIT4 表达及 ROC 分析

GEO 公共数据库中下载三个糖尿病肾病肾小管间质基因芯片 GSE47184, GSE104954, GSE99325。GSE47184 实验平台为 GPL11670 (Human Genome U133 Plus 2.0 芯片; Affymetrix 公司) 和 GPL14663

(Human GenomeHG-U133A Custom CDF 基因芯片; Affymetrix 公司)。GSE104954 实验平台为 GPL24120 (Human Genome U133A 芯片; Affymetrix 公司) 和 GPL22945 (Human Genome U133 Plus 2.0 芯片; Affymetrix 公司)。GSE99325 实验平台为 GPL19109 (Human Genome U133 Plus 2.0 芯片; Affymetrix 公司) 和 GPL19184 (Human Genome U133A 芯片; Affymetrix 公司)。GSE47184 包含来自糖尿病肾病患者的 18 个肾小管样本 (GSM1146387~GSM1146393; GSM1146327~GSM1146337) 和来肾肿瘤切除患者的 6 个对照肾小管样本 (GSM1146427~GSM1146429; GSM1146353~GSM1146355)。GSE104954 包含来自糖尿病肾病患者的 17 个肾小管样本 (GSM2811029~GSM2811035; GSM2810894~GSM2810903) 和来肾肿瘤切除患者的 5 个对照肾小管样本 (GSM2811086~GSM2811088; GSM2810939, GSM2810940)。GSE99325 包含来自糖尿病肾病患者的 18 个肾小管样本 (GSM2641157~GSM2641167, GSM2641285~GSM2641291) 和来肾肿瘤切除患者的 6 个对照肾小管样本 (GSM2641201~GSM2641203; GSM2641325~GSM2641327)。两组间差异结果显示: 三个数据集中, DN 组 DDIT4 的表达明显高于 Control 组(GSE47184, $P=0.0004$; GSE104954, $P=0.0009$; GSE99325, $P=0.0118$)。ROC 分析结果显示: GSE47184 数据库中 AUC 为 0.917, 95%CI (0.730~0.990), Sensitivity=100%, Specificity=83.3%, $P<0.0001$; GSE104954 数据库中 AUC 为 0.894, 95%CI (0.689~0.984), Sensitivity=100%, Specificity=80%, $P=0.0003$; GSE99325 数据库中 AUC 为 0.843, 95%CI (0.637~0.958), Sensitivity=100%, Specificity=83.3%, $P=0.0298$ (Fig.3-1)。

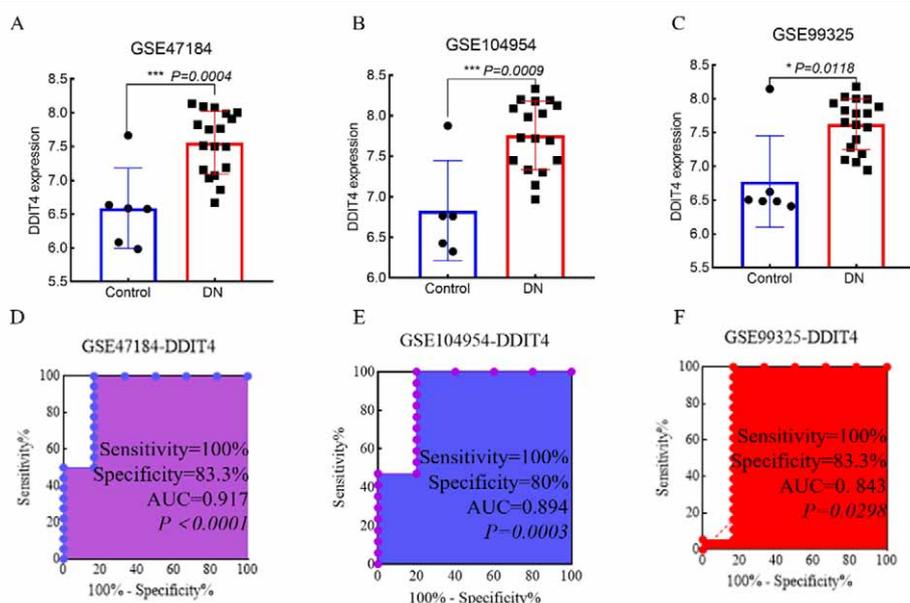


图 3-1 GEO 数据集糖尿病肾病和对照样本 DDIT4 表达及 ROC 分析
 Fig. 3-1 DDIT4 expression and ROC analysis of diabetes nephropathy and control samples in GEO datasets

2. 本中心数据，IHC 检测对照组和 DN 样本中 DDIT4, NLRP3, GSDMD, CCR2 的表达及相关性分析

2.1 糖尿病肾病患者肾脏组织病理学改变

HE 染色结果显示：Control 组肾脏组织中肾小球结构较完整，其肾小管排列整齐，且无基质增生；DN 组肾脏组织中肾小球轮廓不清晰，且肾小管中空泡增加，肾小管排列紊乱，并伴随着炎性浸润，部分细胞萎缩和脱落 (Fig.3-2)；

Masson 染色结果显示：相对于 Control 对照组，DN 组的肾脏组织切片的蓝色区域明显增加，说明糖尿病肾病患者的肾脏组织中胶原纤维明显增加 (Fig.3-3)；

PAS 染色结果显示：与对照 Control 组对比，DN 组的肾脏组织切片出现显著的糖原沉积，并且伴有肾小球系膜基质扩张，基底膜不规则增厚，说明糖尿病肾病患者的肾脏组织中的糖原明显增加 (Fig.3-4)。

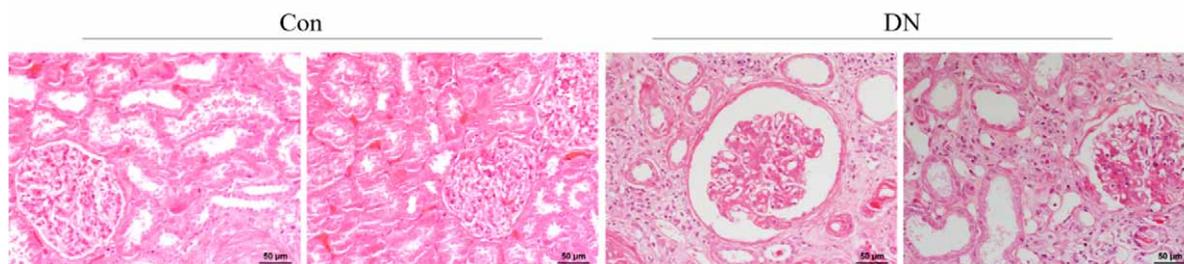


图 3-2 对照组及糖尿病肾病组肾脏组织 HE 染色

Fig. 3-2 HE staining of renal tissue in control group and diabetes nephropathy group

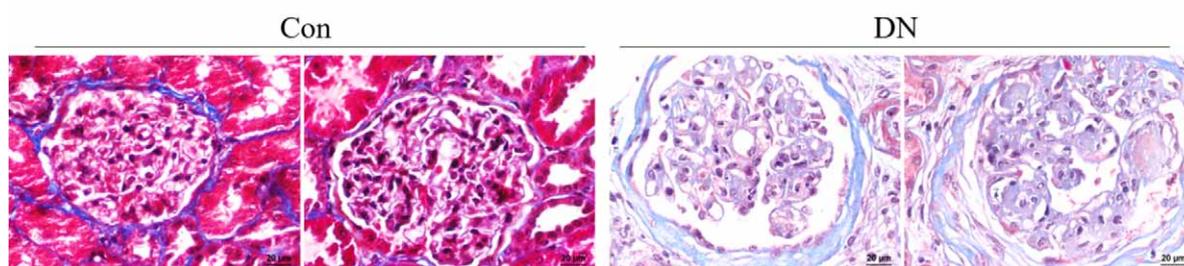


图 3-3 对照组及糖尿病肾病组肾脏组织 Masson 染色

Fig. 3-3 Masson staining of renal tissue in control group and diabetes nephropathy group

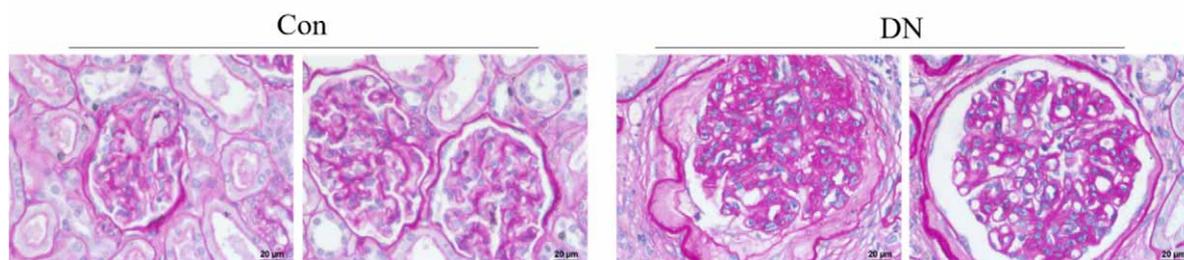


图 3-4 对照组及糖尿病肾病组肾脏组织 PAS 染色

Fig.3-4 PAS staining of renal tissue in control group and diabetes nephropathy group

2.2 糖尿病肾病和对照组人群的临床基本特征

如表 3-1 所示,糖尿病肾病患者和对照人群两组间除了性别没有统计学差异外 (Control 组男性 19 名,占比 63.33%, DN 组男性 24 名,占比 80%, $P=0.1520$),年龄, BMI, FBG, SBP, DBP, Hb, Alb, Urea nitrogen, Scr, UA, eGFR 均存在显著差异 ($P<0.05$) (Table 3-1)。

研究论文

表 3-1 糖尿病肾病和对照组人群的临床基本特征

Table 3-1 Basic clinical characteristics of diabetes nephropathy group and control group

Parameter	Control group	DN group	$\chi^2/t/U$	<i>P</i> value
Gender	19/30	24/30 (80%)	2.052	0.1520
(Male)	(63.33%)			
Age	56.13±13.21	49.47±10.11	290.5	0.0176
BMI	24.44±3.73	27.29±3.78	2.936	0.0048
(kg/m ²)				
FBG	5.36±0.67	9.12±4.62	117.5	<0.0001
(nmol/L)				
SBP	131.1±15.60	147.77±23.05	3.280	0.0018
(mmHg)				
DBP	84.23±9.89	91.87±15.35	2.289	0.0257
(mmHg)				
Hb (g/L)	128.20±17.44	115.73±25.61	2.204	0.0315
Alb (g/L)	40.39±3.54	32.81±7.99	212	0.0003
Urea nitrogen	5.23±1.58	8.64±3.55	119.5	<0.0001
(mmol/L)				
Scr (μmol/L)	72.1±15.37	155.53±128.26	96	<0.0001
UA (mmol/L)	307.43±74.73	396.13±91.93	4.101	0.0001
eGFR	96.42±18.5	55.14±25.89	7.105	<0.0001
(ml/min/1.73 m ²)				

2.3 不同尿蛋白组糖尿病肾病患者的临床特征

以 24h 尿蛋白分类，分为中度蛋白尿组（n=16，<3.5 g/24h）和重度蛋白尿组（n=14，≥3.5 g/24h）。其中 24h 尿蛋白，Hb，Alb，Scr，eGFR，TG 在两组中存在显著差异（*P*<0.05），性别，级别，病程，年龄，BMI，FBG，SBP，DBP，Urea nitrogen，HbA_{1c}（%），UA，TC，LDL 均不存在统计学差异（Table 3-2）。

研究论文

表 3-2 不同尿蛋白组糖尿病肾病患者的临床特征

Table 3-2 Clinical characteristics of the DN patients with different urinary protein

	Overt proteinuria (n=16)		Heavy proteinuria (n=14)		P value
Sex	Female	4	Female	2	0.6567
	Male	12	Male	12	
Stage	II	6	II	2	0.154
	III	9	III	8	
	IV	1	IV	4	
Diabetes history (years)	7.00±3.95		8.71±6.74		0.3954
Age	47.69±8.48		51.50±11.69		0.3110
BMI (kg/m ²)	27.08±4.23		27.23±3.52		0.9391
FBG (nmol/L)	8.20±3.48		10.17±5.61		0.2617
SBP (mmHg)	143.56±22.46		152.57±23.58		0.2934
DBP (mmHg)	91.44±13.76		92.36±17.52		0.8733
Urea nitrogen (mmol/L)	7.71±2.42		9.69±4.36		0.1070
24-h urinary protein	3.27±4.61		6.87±1.83		0.0002
HbA _{1c} (%)	8.20±1.86		9.53±2.58		0.1131
Hb (g/L)	126.13±20.82		103.86±26.04		0.0147
Alb (g/L)	36.81±6.97		28.23±6.64		0.0121
Scr (μmol/L)	129.00±113.20		185.86±141.16		0.0393
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	66.81±26.15		41.81±18.62		0.0060
UA (mmol/L)	387.38±95.61		406.14±90.01		0.5859
TC (mmol/L)	4.71±1.52		5.78±1.59		0.0698
TG (mmol/L)	1.79±0.55		2.70±1.37		0.0198
LDL (mmol/L)	3.2±1.37		3.86±1.75		0.2627

2.4 糖尿病肾病患者肾脏组织中 DDIT4、NLRP3、GSDMD 以及 CCR2 的表达及 ROC 分析

为了探讨 DDIT4 在糖尿病肾病中的作用，进一步验证 DDIT4 通过触发焦亡进而介导炎症积累，最终导致糖尿病肾损伤中机制，收集糖尿病肾病的肾脏组织和对照肾脏组织，检测 DDIT4、NLRP3 和 GSDMD，以及与糖尿病肾病的肾脏损伤和纤维化密切相关的炎症指标 CCR2 的表达，分析其相关性。

免疫组织化学检测 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 的表达，结果显示：与对照相比，糖尿病肾病患者的肾脏组织中 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 的表达明显增强，差异具有统计学意义。

进一步绘制 ROC 曲线，结果显示：DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 对于糖尿病肾病具有一定的诊断能力，DDIT4 AUC=0.992，敏感性为 97.5%，特异性为 100% ($P < 0.0001$)，NLRP3 AUC=0.987，敏感性为 97.5%，特异性为 100% ($P < 0.0001$)，GSDMD AUC=0.994，敏感性为 97.5%，特异性为 100% ($P < 0.0001$)，CCR2 AUC=0.958，敏感性为 92.5%，特异性为 96.7% ($P < 0.0001$) (Fig.3-5)。

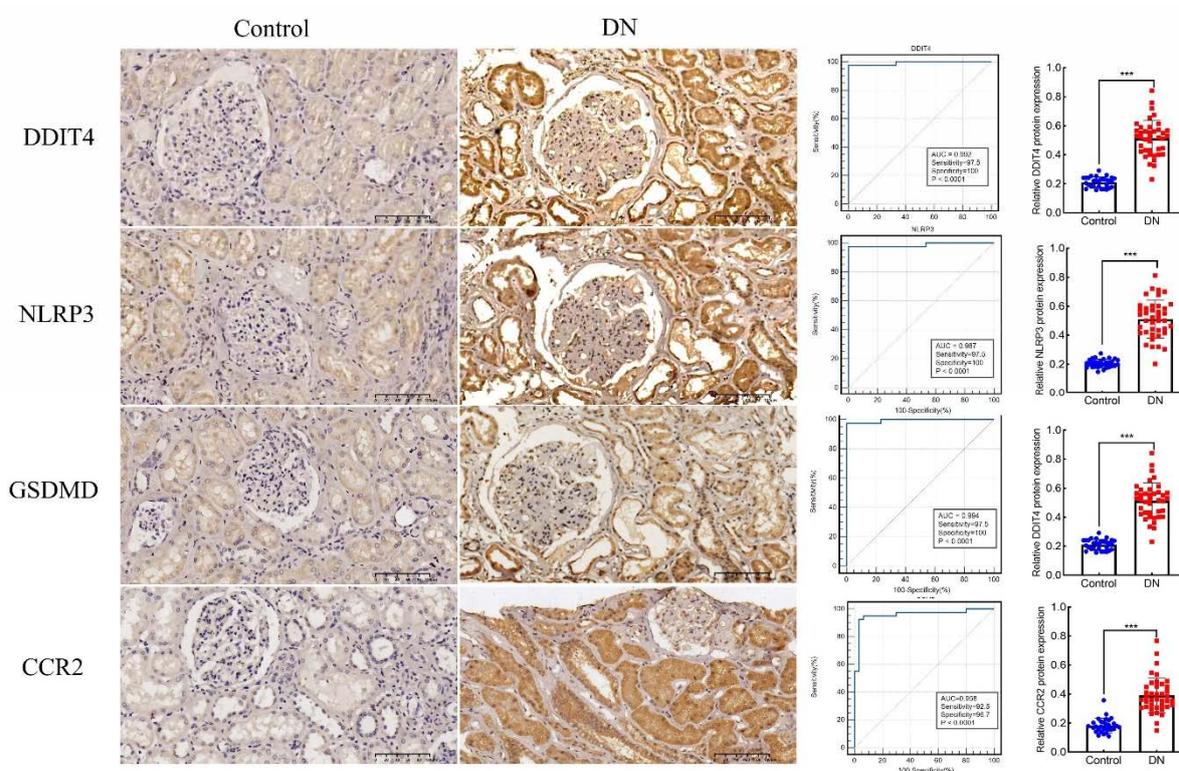


图 3-5 免疫组化检测 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 的表达及

ROC 分析

Fig. 3-5 The expression and ROC analysis of DDIT4、NLRP3、GSDMD and CCR2 detected by IHC, *** $P < 0.001$, vs Control

2.5 连续切片下观察四个基因在糖尿病肾病肾脏组织的表达特点，分析糖尿病患者肾脏组织中 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 蛋白质表达的相关性，结果显示，DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 在肾小管上皮细胞胞浆表达增多，相关性分析显示 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 两两之间存在高度正相关：DDIT4 vs NLRP: $R=0.6469$, $p=0.0001$; DDIT4 vs GSDMD: $R=0.5821$, $P=0.0007$; DDIT4 vs CCR2: $R=0.4980$, $P=0.0051$; NLRP3 vs GSDMD: $R=0.7968$, $P < 0.0001$; NLRP3 vs CCR2: $R=0.4829$, $P=0.0069$; GSDMD vs CCR2: $R=0.4633$, $P=0.0099$ 。提示：DDIT4 参与糖尿病肾损伤的发生，与 NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号密切相关 (Fig. 3-6; Fig.3-7)。

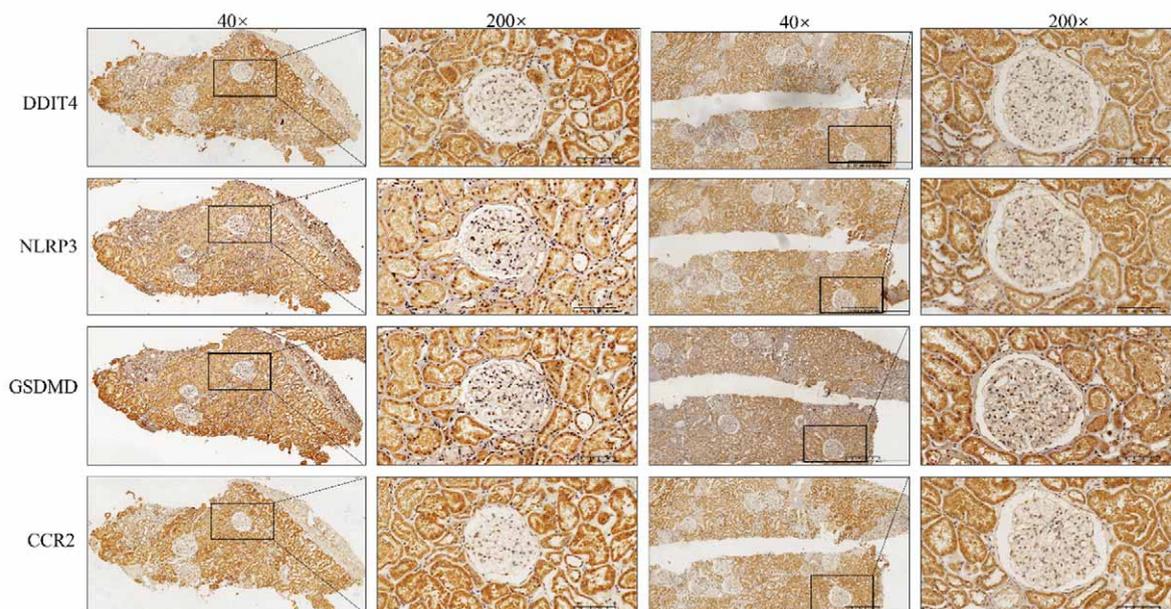


图 3-6 糖尿病肾病肾脏组织连续切片中 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 的表达

Fig.3-6 The expression of DDIT4, NLRP3, GSDMD and CCR2 in serial sections of diabetes nephropathy

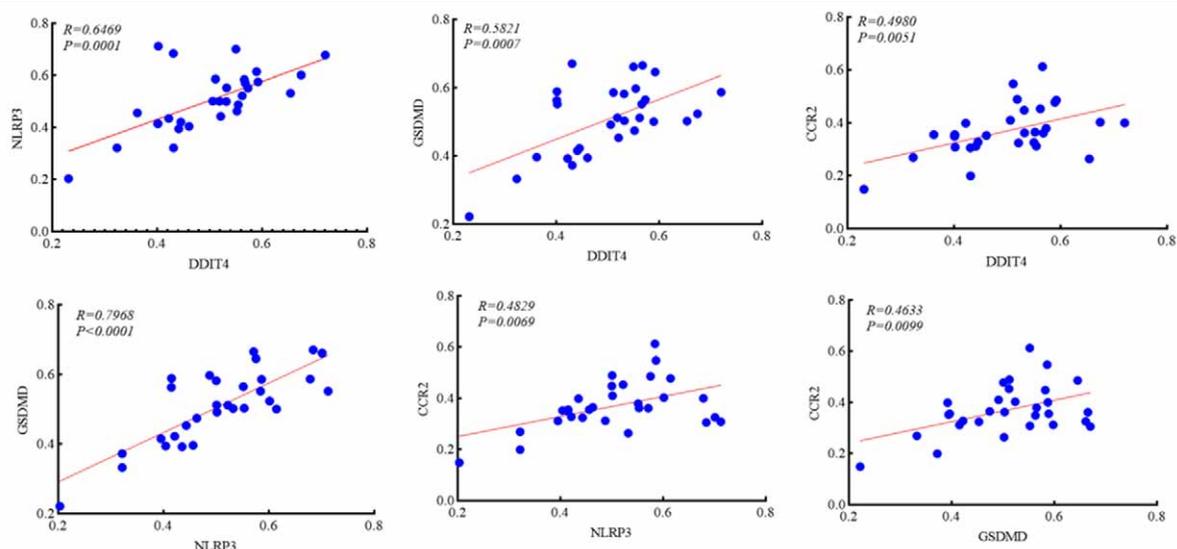


图 3-7 糖尿病肾病肾脏组织中 DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 表达的相关性分析

Fig.3-7 Correlation analysis among DDIT4, NLRP3, GSDMD and CCR2 in renal tissue samples of DN

2.6 糖尿病肾病患者肾脏组织中 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 与临床指标的相关性

分析 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 和糖尿病肾病患者各临床指标的相关性,结果显示: DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 表达水平与糖尿病肾病患者的性别,级别,病程, BMI, FBG, SBP, DBP, HbA_{1c} (%), UA, TC, TG, LDL 均不相关。DDIT4 与 Urea nitrogen ($R=0.5218, p=0.0031$), Scr ($R=0.5180, P=0.0034$) 存在显著的正相关,与 Hb ($R=-0.4102, P=0.0244$), eGFR ($R=-0.5179, P=0.0034$) 负相关; NLRP3 与年龄 ($R=0.4451, p=0.0137$), Scr ($R=0.4377, P=0.0156$), 24h 蛋白尿 ($R=0.3958, P=0.0304$) 存在显著的正相关,与 Hb ($R=-0.3696, P=0.0444$), eGFR ($R=-0.5527, P=0.0015$) 负相关; GSDMD 与 Urea nitrogen ($R=0.3725, p=0.00426$), Scr ($R=0.5093, P=0.004$), 24h 蛋白尿 ($R=0.4314, p=0.0173$) 存在显著的正相关,与 eGFR ($R=-0.5407, P=0.002$) 负相关; CCR2 与年龄 ($R=0.4731, P=0.0083$), Scr ($R=0.3647, P=0.0475$) 之间存在显著的正相关, CCR2 与 Hb ($R=-0.4774, P=0.0076$), Alb ($R=-0.3896, P=0.0333$), eGFR ($R=-0.4350, P=0.0163$) 之间存在显著的负相关 (Fig.3-8)。

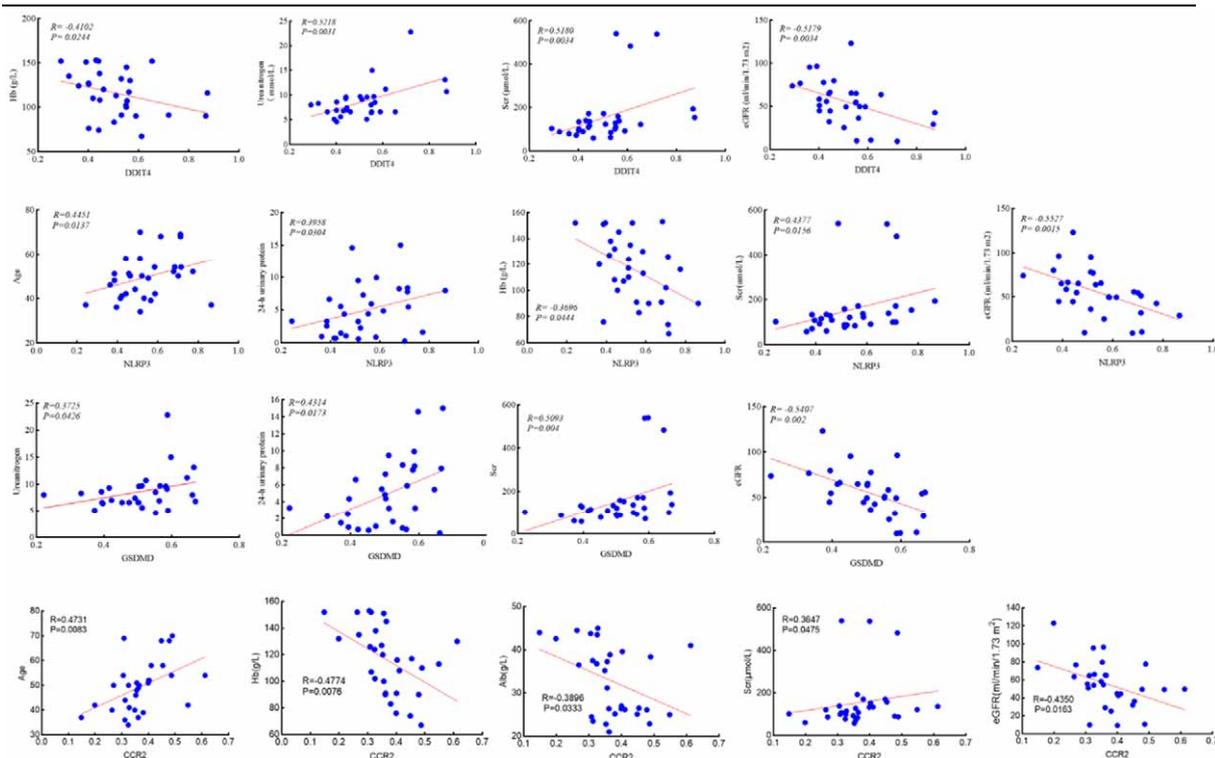


图 3-8 糖尿病肾病患者肾脏组织 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 与临床指标相关性

Fig.3-8 Correlation between DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 and clinical parameters in renal tissue of patients with diabetes nephropathy

3 糖尿病小鼠模型，干预 DDIT4 后小鼠肾脏组织 CCR2 的变化

3.1 STZ 诱导的糖尿病小鼠中，DDIT4 敲除对小鼠肾脏组织 CCR2 的影响

为了确定 DDIT4 对 CCR2 的调控作用，免疫组织化学检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏组织中，敲除 DDIT4 对 CCR2 表达是否有影响，结果显示：与 WT 组小鼠相比，DKO 组小鼠肾脏组织中 CCR2 染色强度降低，而 STZ-WT 组小鼠肾脏组织 CCR2 染色强度增强；与 STZ-WT 组相比，敲除 DDIT4 的小鼠肾脏组织中 CCR2 染色强度减弱 (Fig.3-9)。

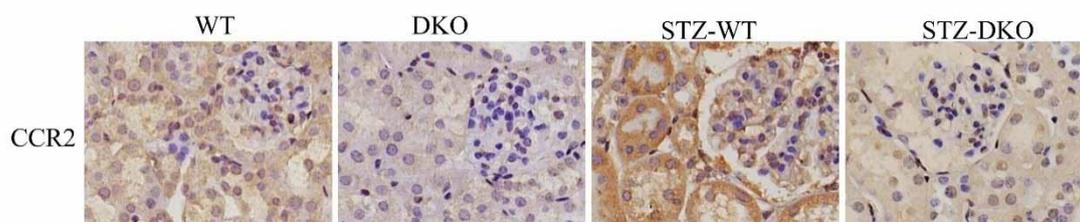


图 3-9 免疫组化检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏组织 CCR2 的表达

(×200)

Fig.3-9 IHC detection of the expression of CCR2 in renal tissue of STZ-induced diabetes mice (×200)

Western Blot 结果显示：同免疫组织化学结果一致，STZ-RKO 组小鼠肾脏组织中，CCR2 的表达被明显抑制 (Fig.3-10)。

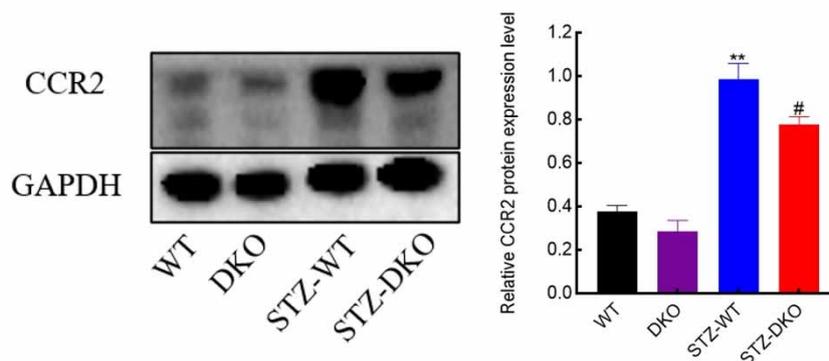


图 3-10 Western Blot 检测 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾 CCR2 的表达
Fig.3-10 The expression of CCR2 in Renal Tissue of STZ-induced diabetes mice detected by western blot, ** $P < 0.01$, vs WT; # $P < 0.05$, vs STZ-WT

3.2 db/db 糖尿病小鼠，DDIT4 敲低对小鼠肾脏组织 CCR2 的影响
免疫组织化学检测 db/db 糖尿病小鼠肾脏组织中，敲低 DDIT4 对 CCR2 表达是否有影响，结果显示：与 db/m 组小鼠相比，db/db 小鼠肾脏组织 CCR2 染色强度增强；与 db/db 组相比，敲低 DDIT4 的小鼠肾脏组织中 CCR2 染色强度下降 (Fig.3-11)。

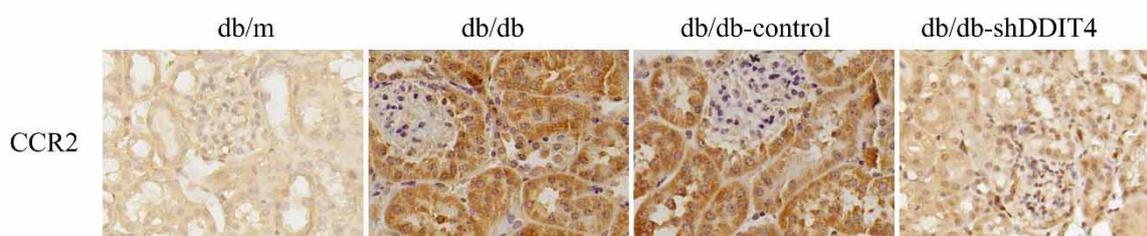


图 3-11 免疫组化检测 db/db 糖尿病小鼠肾脏组织 CCR2 的表达 (×200)
Fig.3-11 IHC detection of the expression of CCR2 in renal tissue of db/db diabetes mice (×200)

Western Blot 结果显示：同免疫组织化学结果一致，DDIT4 敲低的 db/db 糖尿病小鼠肾脏组织中，CCR2 的表达被明显抑制（Fig.3-12）。

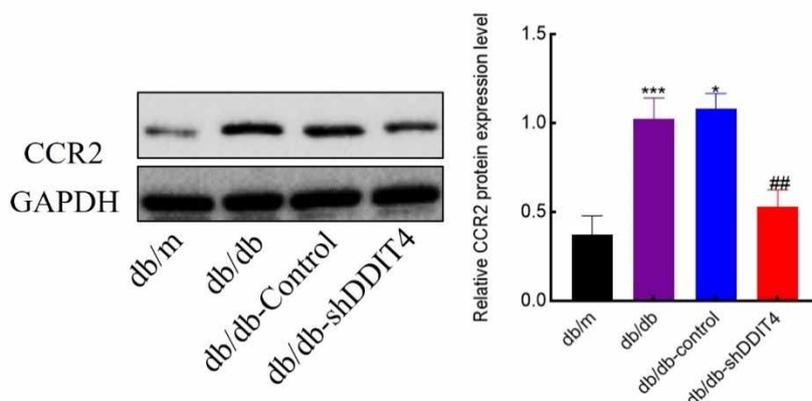


图 3-12 Western Blot 检测 db/db 糖尿病小鼠肾脏组织 CCR2 的表达
Fig.3-12 The expression of CCR2 in Renal Tissue of db/db diabetes mice detected by western blot

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; * vs db/m, # vs db/db

讨 论

糖尿病肾病是糖尿病的一种慢性并发症，可发展为终末期肾衰竭。DN 代表着日益增长的社会经济和全球健康负担，2015 年糖尿病患者中终末期肾病的年发病率达到每百万人 1016 例^[11]。糖尿病控制和并发症试验证明了高血糖在肾脏并发症的发生和进展中的关键作用^[12]。然而，目前与血糖控制联合使用的治疗性干预措施还不足以阻止或逆转 DN 进展^[13,14]。这至少部分是由于缺乏对导致肾脏病理学的特定分子事件的理解。在 DN 的发展过程中，肾小管间质损伤起着关键作用，甚至在肾小球损伤之前。肾小管萎缩和肾小管间质纤维化，被认为是 DN 患者肾功能障碍的主要病理特征。因此肾小管分子表达特征对于深入了解糖尿病肾病分子机制以及寻找防治新靶点至关重要。

越来越多的文献支持应激反应蛋白 DDIT4 在糖尿病并发症中起着关键作用。有研究报道 DDIT4 缺失可预防 STZ 糖尿病小鼠的视网膜病变和视觉功能缺陷^[15-17]。已经确定 DDIT4 介导细胞对许多不利条件的应激反应，包括高血糖症^[18,19]。在糖尿病小鼠视网膜和暴露于高血糖条件下的人视网膜细胞培养物中，REDD1 表达上调与促炎信号相关^[20]。目前关于 DDIT4 对糖尿病肾病的研究并不多见，本研究前两部分已经明确 DDIT4

在糖尿病肾病中的关键作用，以及对糖尿病肾病炎症信号的调控。本部分重点讨论 DDIT4 及其调控的下游在临床糖尿病肾病患者中的具体表达特征和作用。

证据表明，具有免疫调节的炎症过程与糖尿病肾病结构恶化的发生和发展密切相关。炎症细胞的募集、浸润和活化在 DN 的发生发展中起着至关重要的作用。一旦被损伤的肾脏细胞释放，就会触发炎症重塑的进程，进而引起糖尿病肾病的进展。大量证据支持肾小管间质的炎性成分，特别是近端肾小管上皮细胞的炎性成分，在糖尿病肾病的发病机制中起核心作用^[21, 22]。CCR2，即 C-C 基序趋化因子受体 2，位于 3 号染色体上，是 G 蛋白偶联受体超家族的成员，也是单核细胞趋化蛋白 1~4 的受体，是促炎症反应的化学诱导剂^[23]。CCR2 在单核细胞、髓样前体细胞和 T 细胞、树突状细胞和多种组织实质细胞上表达^[8, 9]。靶向 CCR2 已成为限制进行性肾损伤的潜在治疗干预措施和热点。敲除 CCR2 可以减少肾小球硬化和继发性肾小管间质损伤的发生率^[7]。在糖尿病 db/db 小鼠中，使用 CCR2 小分子拮抗剂抑制可以缓解蛋白尿、肾小球硬化和肾衰竭^[24]。Alaa S.Awad 等^[25]表明，CCR2 的药物阻断和遗传缺陷均可通过减少 Ins2Akita 和 STZ 诱导的糖尿病肾病小鼠的蛋白尿、血尿素氮(BUN)、血肌酐、组织学改变、肾脏纤维连接蛋白的表达、巨噬细胞募集和炎性细胞因子的产生来减轻糖尿病小鼠的肾组织损伤。Du 等^[26]发现通过抑制巨噬细胞的侵袭和下调 MCP-1/CCR2 信号通路可减轻糖尿病肾病的肾损害。此外，两种 CCR2 拮抗剂 rs504393 和 ro5234444 可通过减少 2 型糖尿病小鼠肾脏巨噬细胞的浸润而阻断糖尿病肾病的发展^[24, 27]。Dick de Zeeuw 团队进行的一项多中心随机试验显示，招募的 332 名糖尿病病患者，研究开始前至少服用 8 周稳定的抗糖尿病治疗和血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂的标准治疗，之后进行分组研究。与接受安慰剂治疗的 111 名糖尿病肾病患者相比，服用 CCX140-B（一种的 CCR2 选择性抑制剂）的 221 名糖尿病肾病患者的蛋白尿出现继发性下降^[28]。另外，Hong Li 等^[10]报道了在 GSDMD 介导的肝细胞焦亡中，GSDMD 可通过上调 CCR2 来扩大加重急性肝功能衰竭的炎症反应，提示了 GSDMD 与 CCR2 存在调控关系。目前为止关于 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 在糖尿病肾病中的表达、作用及相关性并未见报道。

本部分研究首先在 GEO 数据库中，选择三个糖尿病肾病肾小管表达数据集 GSE47184，GSE99325，GSE104954，确定临床标本中 DDIT4 的表达，ROC 分析显示出 DDIT4 具有高效鉴别糖尿病肾病的能力。进一步选择本中心 40 例糖尿病肾病患者活检肾脏标本以及 30 例对照，免疫组化检测 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 的表达，并分析两两之间相关性和各因子与患者临床参数的关系。结果显示相比对照组，DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号在糖尿病肾病患者肾脏组织中一致高表达，ROC 曲线进一步分析显示 4 个因子对糖尿病肾病均有高效的鉴别诊断能力。相关性分析显示，DDIT4、NLRP3、GSDMD 和 CCR2 两两之间存在高度正相关，表明了 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号通路在糖尿病肾损伤中的协同关系。根据搜集的临床参数信息，40 例 DN 患者中有 30 例信息完整，被用于进一步相关性分析。DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 与 DN 患者肾功能指标高度相关，进一步说明了 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号通路在糖尿病进行性肾病中的关键作用。此外，敲除 DDIT4 的 STZ 诱导糖尿病小鼠和敲低 DDIT4 的 db/db 糖尿病小鼠的肾脏组织中，CCR2 蛋白表达的降低，进一步验证了糖尿病肾病时 DDIT4 对 CCR2 的调控作用。

综上所述，通过临床标本和 1/2 型糖尿病小鼠标本检测，我们确定了 DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号通路在糖尿病进行性肾病中的关键作用，靶向 DDIT4 是治疗糖尿病肾脏炎症性损伤的潜在靶点。

小 结

- 1.三个糖尿病肾病 GEO 数据集均证实 DDIT4 在 DN 组肾小管高表达。
2. DDIT4/NLRP3/ GSDMD/CCR2 在 DN 患者肾脏组织连续切片中显示出一致的高表达，且两两正相关。
3. DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 与 DN 患者的肾功能指标存在相关性。
4. 在糖尿病小鼠肾脏组织中，DDIT4 对 CCR2 有调控作用。

参考文献

1. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6):327-340.
2. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis[J]. *Lancet*, 1968, 2(7564):363-366.
3. Bohle A, Müller GA, Wehrmann M, et al. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides[J]. *Kidney Int Suppl*, 1996, 54: S2-9.
4. D'Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP. Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage[J]. *Am J Kidney Dis*, 1995, 26(1):124-132.
5. Zhao J, Chen J, Zhu W, et al. Exosomal miR-7002-5p derived from highglucose-induced macrophages suppresses autophagy in tubular epithelial cells by targeting Atg9b[J]. *FASEB J*, 2022, 36(9):e22501.
6. Wang X, Li R, Liu T, et al. CD163 in Macrophages: A Potential Biomarker for Predicting the Progression of Diabetic Nephropathy based on Bioinformatics Analysis[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022.
7. Wilkening A, Krappe J, Mühe AM, et al. C-C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35(2):227-239.
8. Mack M, Cihak J, Simonis C, et al. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice[J]. *J Immunol*, 2001, 166(7):4697-4704.
9. Osterholzer JJ, Curtis JL, Polak T, et al. CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*[J]. *J Immunol*, 2008, 181(1):610-620.
10. Li H, Zhao XK, Cheng YJ, et al. Gasdermin D-mediated hepatocyte

- pyroptosis expands inflammatory responses that aggravate acute liver failure by upregulating monocyte chemoattractant protein 1/CC chemokine receptor-2 to recruit macrophages[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(44):6527-6540.
11. Cheng HT, Xu X, Lim PS, et al. Worldwide Epidemiology of Diabetes-Related End-Stage Renal Disease, 2000-2015[J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(1):89-97.
 12. Barr CC. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive insulin therapy, by The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N. Engl. J. Med* 342:381-9, 2000[J]. *Surv Ophthalmol*, 2001, 45(5):459-460.
 13. Abdel-Rahman EM, Saadulla L, Reeves WB, et al. Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: standard and emerging approaches[J]. *J Gen Intern Med*, 2012, 27(4):458-468.
 14. Yamazaki T, Mimura I, Tanaka T, et al. Treatment of Diabetic Kidney Disease: Current and Future[J]. *Diabetes Metab J*, 2021, 45(1):11-26.
 15. Regazzetti C, Dumas K, Le Marchand-Brustel Y, et al. Regulated in development and DNA damage responses -1 (REDD1) protein contributes to insulin signaling pathway in adipocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52154.
 16. Elam MB, Cowan GS Jr, Rooney RJ, et al. Hepatic gene expression in morbidly obese women: implications for disease susceptibility[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2009, 17(8):1563-1573.
 17. Rivera-Gonzalez GC, Klopotek A, Sabin K, et al. Regulated in Development and DNA Damage Responses 1 Prevents Dermal Adipocyte Differentiation and Is Required for Hair Cycle-Dependent Dermal Adipose Expansion[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(9):1698-1705.e1.
 18. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, et al. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29):27053-27058.

19. Sinha I, Allen JE, Pinto JT, et al. Methylseleninic acid elevates REDD1 and inhibits prostate cancer cell growth despite AKT activation and mTOR dysregulation in hypoxia[J]. *Cancer Med*, 2014, 3(2):252-264.
20. Nguyen QD, Schachar RA, Nduaka CI, et al. Dose-ranging evaluation of intravitreal siRNA PF-04523655 for diabetic macular edema (the DEGAS study) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(12):7666-7674.
21. Tang S, Leung JC, Abe K, et al. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(4):515-527.
22. Tang SC, Lai KN. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(8):3049-3056.
23. Hasegawa K, Fujimoto T, Mita C, et al. Single-cell transcriptome analysis of fractional CO₂ laser efficiency in treating a mouse model of alopecia[J]. *Lasers Surg Med*, 2022, 54(8):1167-1176.
24. Sayyed SG, Ryu M, Kulkarni OP, et al. An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(1):68-78.
25. Awad AS, Kinsey GR, Khutsishvili K, et al. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(6):F1358-1366.
26. Du Q, Fu YX, Shu AM, et al. Loganin alleviates macrophage infiltration and activation by inhibiting the MCP-1/CCR2 axis in diabetic nephropathy[J]. *Life Sci*, 2021, 272:118808.
27. Kang YS, Lee MH, Song HK, et al. CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9):883-894.
28. de Zeeuw D, Bekker P, Henkel E, et al. The effect of CCR2 inhibitor CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(9):687-696.

结 论

1. DDIT4 在高糖培养的肾小管上皮细胞, 1/2 型糖尿病小鼠肾脏组织, 以及糖尿病肾病患者肾脏组织中高表达。

2. 高糖诱导下, DDIT4 通过促进 NLRP3 炎症小体激活介导肾小管上皮细胞焦亡和纤维化反应的发生。

3. DDIT4/NLRP3/GSDMD/CCR2 炎症信号通路在糖尿病肾病时被激活, 两两之间存在正相关。

糖尿病肾病分子标志物的研究

据国际糖尿病联合会统计, 2021 年患有糖尿病的成年人(20-79 岁)高达 5.37 亿, 占 10%。预计到 2030 年, 患者人数将达到 6.43 亿, 到 2045 年将达到 7.83 亿^[1]。糖尿病肾病是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一, 与糖尿病患者的发病率和死亡率增加有关^[2]。DN 占终末期肾病发病率的 30%~50%, 估计约 40%的患者需要肾替代治疗^[3]。DN 给患者的生活带来了巨大的压力, 不仅是身体上和经济上的, 而且是心理上的。

糖尿病肾病由长期暴露于高血糖引起, 导致肾脏结构和功能的进行性改变。DN 的早期发展在临床上是无声的, 当检测到蛋白尿时, 病变往往处于晚期, 导致肾功能迅速下降, 走向终末期肾病。如果在早期发现和处理, DN 的进展可以被阻止或大大延迟。糖尿病肾病在临床表现、组织病理学和进展速度方面是一种异质性疾病, 这使得难以开发有效的治疗方法。目前, DN 的诊断和预后主要依赖于白蛋白排泄率和肾小球滤过率。虽然肾活检是诊断肾脏疾病的金标准, 但它是一种有创检查, 只有存在严重肾损伤时才进行的。以前认为白蛋白尿先于 DN 患者肾功能下降, 但最近的流行病学研究显示, 有一组独特的患者表现为肾功能障碍, 但没有出现白蛋白尿。在过去, 特别是从 1 型糖尿病患者的观察来看, DN 的临床分期被认为是从早期肾小球高滤过开始, 随后发展为微量白蛋白尿、大量白蛋白尿, 然后 GFR 下降。然而, 在最近对 2 型糖尿病的研究中, 许多 DN 患者并没有表现出上述经典的逐步变化。况且, 许多微量白蛋白尿患者恢复到正常尿白蛋白排泄的可能性大于发生严重蛋白尿的可能性^[4]。因此, DN 的自然史概念正在发生变化, 并在不断发展^[5]。这强调了蛋白尿作为检测糖尿病肾病和预测其风险的生物标志物缺乏敏感性和特异性。

因此, 需要新的生物标志物不仅可以更好地评估 DN 患者的肾脏状况, 还可以及时表征药物治疗的效果, 以达到最佳的药物剂量和类型。考虑到 DN 是一个复杂的疾病过程, 涉及多种病理生理机制, 如高血糖诱导的炎症、氧化应激、肾小管损伤, 最终导致肾脏损伤和纤维化, 许多新的生物标志物已经开发出来, 可以捕捉疾病的一种特定机制。此外, 越来越

多地使用高通量组学方法来分析生物样本,包括蛋白质组学、代谢组学和转录组学,已成为发现生物标志物的强大工具。本文将旨在介绍目前 DN 的临床生物标志物,以及多种潜在的新型生物标志物的现状。

1. 糖尿病肾病的流行病学

糖尿病患者中有相当一部分会发展为糖尿病肾病。糖尿病控制和并发症试验以及糖尿病干预和并发症流行病学研究表明,在 1 型糖尿病患者中,经过平均 24 年的随访,23%的强化治疗患者和 36%的常规治疗患者会出现白蛋白尿^[6]。一项英国前瞻性糖尿病研究表明,2 型糖尿病患者,经过中位 15 年的随访,38%的患者出现蛋白尿,其中 28%的患者出现肾功能衰竭^[7]。在不同区域的研究中,糖尿病人群中糖尿病肾病的患病率从 30%以下到 80%以上不等^[8]。尽管糖尿病患者中 DN 的患病率在过去十年中基本保持不变^[9,10],但全球糖尿病患病率的上升轨迹意味着 DN 风险人群的增加^[11]。DN 是世界许多地区 ESKD 的主要原因,在美国占 ESKD 患者的 47%,在包括马来西亚和新加坡在内的国家高达 60%以上^[12]。

2 糖尿病肾病生物标志物

DN 患者,肾小球损伤是一个持续且不可阻挡的过程。其特征是弥漫性和结节性系膜扩张、肾小球基底膜增厚、细胞外基质过度堆积和足细胞丢失,影响肾小球毛细血管,并破坏肾小球的结构完整性^[13,14]。这些改变最终导致蛋白尿增加和肾功能受损^[15]。最近的报道显示,肾小管间质在 DN 的发病机制中发挥着不可或缺的作用,并与肾功能的进行性下降密切相关^[16]。DN 的近端肾小管细胞损伤包括基底膜增厚、肾小管病变、肾小管肥大和肾小管纤维化^[17]。

DN 的发病机制复杂,涉及多个生化过程的相互作用,导致肾脏结构和功能损害。这种损害通常是由持续的、管理不善的高血糖引起的,高血糖引发了许多与 DN 进展有关的下游机制,例如氧化应激、缺氧和纤维化等。DN 的发病机制仍在迅速发展,在糖尿病研究中是一个不断增长的领域。最终,肾损伤以肾小球硬化、系膜扩张和小管间质纤维化为特征。临床上表现为蛋白尿和 eGFR 降低。近年来,大量注意力转向了 DN 生物标志物的发现和鉴定。据报道,多种生物标志物与 eGFR 和白蛋白尿相关。这些主要是与 DN 的炎症和肾损伤途径有关的生物标志物。生物标志物的研究涉及单个或多个候选标志物组合的评估。

2.1 DN 中的炎症生物标志物

炎症被认为是 DN 发病机制中的一个关键角色^[18, 19]。各种分子与炎症反应有关, 促炎细胞因子、趋化因子、粘附分子和各种生长因子构成了炎症的分子特征^[20, 21]。研究的一些生物标志物包括粘附分子, 如细胞间粘附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1), 和炎症因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C 反应蛋白 (CRP)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、白介素-1、6、8、17、18、19 等。高血糖引起细胞损伤, 引发这些促炎介质的释放, 导致炎症细胞如巨噬细胞、单核细胞、活化的 T 淋巴细胞和 NLRP3 炎症小体被募集到肾脏^[22, 23]。巨噬细胞在肾小球中的积累产生细胞因子、活性氧和蛋白酶, 导致肾脏损伤和纤维化, 导致 DN 进展^[24]。广泛的生物标志物不仅表明了 DN 中炎症过程的存在, 而且表明了炎症过程的复杂性。这使得它成为寻找新型生物标志物的一个有吸引力的途径^[21]。多项研究调查了炎症生物标志物与 DN 的相关性, 并评估了这些标志物的预测或诊断能力。

TNF- α

在炎性细胞因子中, TNF- α 是迄今为止研究最广泛的分子^[25]。TNF- α 是一种多效性炎症因子, 主要由单核细胞、巨噬细胞和 T 细胞产生^[26]。与健康个体相比, DN 患者通常具有更高的 TNF- α 水平。在这些患者中, 与无蛋白尿的患者^[27]相比, 蛋白尿患者的 TNF- α 水平甚至更高。TNF- α 与 1 型(TNFR1)和 2 型(TNFR2) TNF- α 受体结合, 两者都以可溶性形式存在于循环中。已知 TNF- α 对肾小球和系膜细胞具有细胞毒性作用, 从而引起肾损伤^[28]。动物和人体研究表明, DKD 患者尿 TNF- α 排泄和血清 TNF- α 水平均升高^[29]。由于 TNF- α 在 DN 进展中的作用, 许多治疗药物已经开发出针对这种炎症细胞因子。己酮可可碱是一种磷酸二酯酶抑制剂, 具有抗炎特性, 以及降低 TNF- α 、干扰素- γ 、IL-1 和 IL-6 水平的能力, 是目前正在广泛研究的治疗药物之一^[30]。在一项对 61 例 DN 和残余白蛋白尿患者的前瞻性研究中, 将己酮可可碱添加到 Ang II 受体阻断剂中可减少尿 TNF- α 排泄, 从而产生附加抗蛋白尿作用^[31]。

MCP-1

C-C 基序趋化因子 2 (CCL2, 也被称为单核细胞趋化蛋白-1, MCP-1), 它促进巨噬细胞在肾脏的浸润^[32], 被认为可作为 DN 小管损伤程度和肾炎

症的标志物^[33]。MCP-1 在 DN 患者中显著上调, 并与小管间质损伤程度呈正相关, 提示 MCP-1 可能参与了 DN 的发展过程, 可能是一种潜在的诊断标志物^[34, 35]。在糖尿病肾损伤小鼠模型中, MCP-1 水平在肾脏中逐渐升高。此外, 体外研究表明, MCP-1 在高浓度葡萄糖的存在下表达增加^[36], 1 型和 2 型糖尿病动物模型显示敲除 MCP-1 后肾损伤减轻^[37-39]。在临床中, 微量白蛋白尿或白蛋白尿型糖尿病患者尿中 MCP-1 水平明显高于正常白蛋白尿型糖尿病患者或健康对照组。此外, 尿 MCP-1 水平随着 DN 的进展而升高, 且与 DN 的其他危险因素显著相关。另外, 有报道发现马钱素可以缓解 DN, 就是通过抑制 MCP-1/CCR2 信号通路, 从而抑制 DN 中巨噬细胞的浸润和活化, 进而改善 DN 肾损伤^[40]。由于 CCL2 抑制的有益作用, CCL2 抑制剂 Emapticap pegol 的临床试验目前正在进行中。

ICAM-1

细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 是一种粘附分子, 在内皮细胞、系膜细胞和上皮细胞中表达。ICAM-1 可以与白细胞表面整合素结合, 促进其与内皮细胞的粘附和转运^[25]。ICAM-1 在促炎因子刺激下表达, 尤其是 TNF- α 的作用下上调^[41]。TNF- β 诱导的细胞外基质积累引起的血流动力学改变也是导致 ICAM-1 上调的因素之一。此外, 氧化应激也能促进 ICAM-1 的表达^[42]。在肾系膜和内皮细胞中, 血管紧张素诱导 ROS 的产生, ROS 激活 NF- κ B 并加速促炎细胞因子和粘附分子的释放^[43]。ICAM-1 介导了巨噬细胞向糖尿病肾脏的浸润^[44]。另外其在白细胞迁移中, 尤其是 T 细胞向肾脏的迁移中起着关键作用^[44]。在糖尿病小鼠中敲除 ICAM-1 可改善 DN 症状, 如肾小球肥大、系膜基质扩张和蛋白尿均会得到改善^[44]。

其他已研究的炎症标志物有包括血清 E-选择素、IL-6、纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1)、血管细胞粘附蛋白-1 (VCAM-1) 和 C 反应蛋白 (CRP) 等。在糖尿病控制和并发症试验研究中, 纳入了 1237 例基线时无白蛋白尿和心血管病的患者, 高水平的炎症标志物, 主要是 E-选择素和可溶性 TNFR1 (肿瘤坏死因子受体 1) 和 TNFR2 (肿瘤坏死因子受体 2) 水平是 T1DM 患者发生白蛋白尿的重要预测因素^[45]。在 Joslin 队列中, 虽然研究了包括 TNF、ICAM-1、VCAM-1、PAI-1、IL-6 和 CRP 在内的标志物, 但只有循环 TNFR2 是 1 型糖尿病和蛋白尿患者肾功能下降的主要决定因素。T1DM 患者循环 TNFR 浓度升高是伴蛋白尿和不伴蛋白尿患

者随后进展为 ESKD 的强预测因素^[46]。

2.2 肾小球损伤标志物

肾小球的结构异常之一系膜扩张程度与 DN 的发生有关。在没有血压升高或肌酐清除率降低的情况下,对有或没有微量白蛋白尿的糖尿病患者肾小球结构的广泛研究发现,肾小球结构变化有显著差异(例如系膜基质扩张)。肾小球生物标志物包括起源于肾小球的足细胞、内皮细胞、基底膜和系膜基质等结构的标志物。例如,转铁蛋白、免疫球蛋白 G (IgG) 和层粘连蛋白。

转铁蛋白

转铁蛋白是一种分子量为 76.5KDa 的蛋白质。由于其低分子量和较少的离子负载,它很容易通过肾小球屏障过滤^[47]。由于在 2 型糖尿病正常白蛋白尿患者中,发现尿转铁蛋白增加,同时伴有尿铜蓝蛋白和免疫球蛋白 G,发生在微量白蛋白尿之前,它可被认为是早期 DN 的生物标志物^[48]。在微量白蛋白尿患者中,尿转铁蛋白水平升高^[49]。最初尿转铁蛋白排泄水平高的患者会比正常水平的患者更频繁地出现微量白蛋白尿^[50]。

免疫球蛋白 G

免疫球蛋白 G 是一种分子量为 150kDa 的阴离子血浆蛋白,难以通过肾小球屏障。如上所述,尿 IgG 可在微量白蛋白尿出现前分泌,并伴有尿转铁蛋白、尿铜蓝蛋白和尿 α -酸性糖蛋白^[48]值升高。因此,尿 IgG 排除的增加可以预测糖尿病患者的微量白蛋白尿^[48]。

层粘连蛋白

层粘连蛋白是肾小球基底膜的组成部分。在正常白蛋白尿 2 型糖尿病患者中,其尿排泄量增加,与 NAG (n -乙酰- β -d-葡萄糖苷酶)和 α -1 微球蛋白排泄量相关,同时 IV 型胶原蛋白的排泄增加^[51]。

IV 型胶原蛋白

IV 型胶原是肾小球基底膜和系膜基质的一种成分^[52]。在 DN 中,肾小球毛细血管水平和系膜水平均发生损伤。IV 型胶原在尿液中的排泄可能是 DN 有关肾损伤的早期指标^[53]。据报道,1 型糖尿病的正常白蛋白尿患者中 IV 型尿胶原水平上调,它可能是用于 DN 早期诊断的生物标志物^[54]。其他作者也报道了 1 型糖尿病患者 IV 型胶原和层粘连蛋白排泄增加^[55]。据报道,在蛋白尿正常、糖耐量受损的患者中,尿 IV 型胶原排泄量

也很高^[56]。并且尿 IV 型胶原蛋白可以反映 2 型糖尿病患者的肾脏形态学改变。据报道, 2 型糖尿病病人的肾脏组织学病变严重程度与尿 IV 型胶原之间存在关系^[57]。IV 型尿胶原被认为是早期 DN 的特异性指标^[58]。它还可以检测 2 型糖尿病患者的早期 DN, 并对肾小球肾炎进行鉴别诊断, 因为肾小球肾炎的胶原水平较低^[59]。

PCX

Podocalyxin (PCX) 是一种足细胞膜蛋白, 是肾小球基底膜电荷屏障的主要组成部分。肾小球滤过屏障通透性与 PCX 完整性相关^[60]。PCX 作为足细胞损伤的标志蛋白, 足细胞损伤可导致肾小球 PCX 水平下降, 排泄增加^[61]。在糖尿病患者中, 尽管在微量蛋白尿期和大量蛋白尿期尿 PCX 水平维持在 65% 左右, 但在正常蛋白尿期, 有 53.8% 的患者尿上清中 PCX 蛋白浓度高于临界值^[61]。此外, 与肾小球 PCX 高表达组相比, 低表达组 DN 患者糖尿病病程更长, 且高表达组肾脏存活率明显高于低表达组^[62]。说明 PCX 在表征 DN 患者发病阶段方面具有一定的价值^[62]。

2.3 肾小管损伤标志物

过去认为 DN 是一种以血管损伤为主要特征的肾小球疾病。肾小管间质病变与肾小球损伤在 DN 期间相关^[63]。最近有研究报道晚期 DN 患者有明显的肾小球病理改变或蛋白尿。肾小管生物标志物的研究已经表明肾小管功能障碍可在 DN 早期出现, 有时甚至先于肾小球损伤^[64]。认为肾小管疾病、肾间质纤维化与肾功能进行性恶化的关系更为密切, 可作为相对独立的评价和预测肾脏疾病进展的指标^[65-67]。此外, 肾小管间质在肾实质占比 > 90%, 并与关键功能的变化紧密相关, 表明肾小管间质损伤在 DN 的进展中起着核心作用^[68, 69]。在慢性肾脏疾病的发展过程中, 肾间质纤维化是 DN 的一个关键病理变化和主要病理特征, 伴有肾小管萎缩、细胞外基质积聚和肌成纤维细胞扩张, 能较好地反映肾脏损害的程度和程度^[70, 71]。在肾间质纤维化中, 肾小管的组织病理学改变可能是初始因素, 已被认为是蛋白尿的重要原因^[69]。因此, 鉴定 DN 患者肾小管损伤的易感基因对于阐明本病的病因和探索潜在的治疗方法具有重要意义。肾小管间质损伤比肾小球或血管损伤更适合和更有效地预测肾病患者的肾脏疾病状况。因此, 尤其应重视肾小管病变的生物标志物, 这对 DN 早期患者的诊断和治疗具有重要价值。

肾小管损伤的标志物包括肾损伤分子 1 (KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)、 α -1-微球蛋白、N-乙酰- β -d-葡萄糖苷酶 (NAG)、胱氨酸抑制素 C 和肝型脂肪酸结合蛋白 (L-FABP) 等。被研究得最广泛的标记物是 KIM-1。

KIM-1

KIM-1 (肾损伤分子-1) 是肾脏近端小管上皮细胞的一种跨膜糖蛋白, 以应对损伤并促进肾纤维化。KIM-1 可能进入循环, 因为在早期损伤中, 跨上皮通透性增加或上皮细胞极性丧失, 基底外侧膜表达在肾脏结构或功能正常时无法检测到, 但在肾小管损伤时可显著上调。因此, KIM-1 可作为近端小管损伤的潜在生物标志物^[72]。一些纵向研究已经报道了肾小管损伤标志物 KIM-1 作为预测 DN 发展和进展的潜在候选。在一项嵌套病例对照研究和一项前瞻性队列研究中, KIM-1 与早期或晚期 DN 患者 eGFR 下降风险较高独立相关^[73], 在预测 eGFR 下降 ≥ 30 ml/min/1.73 m² 或从基线下降 $\geq 50\%$ 时, 临床模型中纳入加入 KIM-1 后 AUC 从 0.68 增加到 0.735^[73]。最近, 在一项来自慢性肾功能不全队列的 894 名 DN 患者的病例队列研究中, 较高的血浆 KIM-1 水平与 DN 进展风险增加相关^[74]。值得注意的是, Colombo 等^[75-77]最近发表的三篇论文, 报道了 KIM-1 在预测 eGFR 下降 $\geq 20\%$ 、进展到 eGFR < 30 ml/min/1.73 m² 和 eGFR 快速下降方面的卓越表现。KIM-1 和 β 2MG 是两个入选的肾损伤生物标志物, 它们与 eGFR 快速下降, 进展风险增加相关, OR 分别为 1.93 和 3.19^[78]。因此, KIM-1 是一个有吸引力的生物标志物, 在 DN 中具有很强的潜力。尽管 KIM-1 显示出显著的预测潜力, 但一些研究提出了相反的观点。在一项涉及 527 名 1 型糖尿并受试者的研究中, KIM-1 是一个组合的一部分, 在预测 eGFR < 60 ml/min/1.73 m² 和微量白蛋白尿方面, AUC 没有显著改善, $p > 0.05$ ^[79]。此外, KIM-1 不能预测 T1D 患者在 6 年内进展为蛋白尿和 ESKD, HR 0.8-1.2, $p > 0.05$ ^[80]。KIM-1 同样无法预测 T2D 患者 14 年内发生 ESKD 的风险, HR 0.95, 也没有显著改善 C-指数, $p = 0.725$ ^[81]。两项报告 KIM-1 表现不佳的研究均是将 ESKD 作为肾脏结果。因此, 尽管 KIM-1 是一种有潜力的生物标志物, 但其与肾功能下降的关系仍存在疑问。

β 2MG

β 2MG (Beta-2-microglobulin, β 2-微球蛋白) 是主要组织相容性 I 类分

子的小亚基，分子质量为 11.8kDa，存在于所有有核细胞中。 β 2MG 在肾小球过滤，并被肾近端小管重新吸收^[72]。 β 2MG、cystatin C、NGAL 和 OPN 联合预测 DN 进展到 $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ，可显著提高 AUC。 β 2MG 在三项涉及 T2D 受试者的独立研究中 AUC 仅为 0.792、0.652 和 0.58^[82-84]。另外，关于 β 2MG 作为 DN 诊断标志物的报道也有矛盾的意见。 β 2MG 与 2 年内 $eGFR$ 或 ESKD 下降 $\geq 50\%$ 没有相关联系，HR 为 1.23(0.94-1.62)^[63]。同样地，Meredith C Foster 等^[85]的研究中，招募 250 名患有 2 型糖尿病患者，在多变量模型中，血清 β 2MG 与 ESRD 相关，但是调整 $mGFR$ 和临床变量后， β 2MG 指标的加入，增加了预测死亡率的 C-指数，但 ESRD 没有改善，HR 为 1.54(0.98-2.42)， $p > 0.05$ 。

NGAL

NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) 是一种 25 kDa 的蛋白质，属于脂素超家族，最初在活化的中性粒细胞中发现，但也在肾小管细胞中产生，以应对肾小管损伤。已有研究表明，正常白蛋白尿的 DN 患者尿 NGAL 水平升高^[86]，也有研究表明，在 T1DM 患者中，NGAL 水平升高会导致微量白蛋白尿^[87, 88]。在另一项涉及 117 例 T2DM 患者的研究中，在正常蛋白尿的 T2DM 患者中观察到尿 NGAL 值较高，微量和大量蛋白尿的 T2DM 患者中 NGAL 值依次升高，这表明即使在 DN 的早期阶段也可能发生小管损伤^[86]。

Cystatin C

胱氨酸抑素 C (Cystatin C)，13kDa，它是一种具有半胱氨酸蛋白酶作用的低分子量蛋白质，是由体内有核细胞产生^[89]。在肾小球中自由过滤，然后被近端小管完全重新吸收和代谢，是目前常用的一种敏感小管损伤标志物。血清和尿胱抑素 C 是评估 2 型糖尿病早期肾病的有用生物标志物^[89]。一项 742 例 2 型糖尿病患者的横断面研究显示，尿胱抑素 C 水平可作为评价 2 型糖尿病患者早期肾功能损害的有效指标^[90]。它在糖尿病和糖尿病前期肾病早期增加^[91]。微量白蛋白尿患者的尿胱抑素 C 含量高于无微量白蛋白尿患者，尿胱抑素 C 对糖尿病肾病的进展具有预测作用^[92]。在伴有正常白蛋白尿的 2 型糖尿病患者中，包括 $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 的患者，尿胱氨酸抑素 C 水平可作为判断肾功能不全的独立因素^[89]。通过胱抑素 C 评估肾小球滤过率被认为是一种不受体重

影响的方法，与使用血清肌酐的方法具有可比性，甚至更好^[93]。因为肾小管损伤后尿胱氨酸抑制素 C 浓度升高，尿胱氨酸抑制素 C 与肌酐比值已被证明可以独立预测 T2DM 患者慢性肾病 3 期的发展。然而，在对 eGFR >60 mL/min/1.73 m² 且无基线蛋白尿患者的单独分析中，该比率与 eGFR 下降率无关^[92]。Uslu 等发现血清胱抑素 C、尿 NAG、乳酸氢酶、碱性磷酸酶活性与血清肌酐水平呈显著正相关^[94]。

NAG

NAG (Urinary N-Acetyl-β-D glucosaminidase, NAG) NAG 是一种位于近端小管细胞溶酶体中的酶^[95]。NAG 是一种广泛分布于器官中的水解酶。NAG 相对分子量较大，为 13000kDa，不易被肾小球过滤。然而在功能障碍，即近端小管细胞损伤的情况下，NAG 被大量排出到尿液中，这可能是 1 型糖尿病患者出现微量白蛋白尿的前兆，因此 NAG 可以作为一种敏感的小管生物标志物^[95,96]。在 2 型糖尿病患者中，尿 NAG 排泄与糖尿病病程成比例增加。它发生的时间比蛋白尿早得多，因此 NAG 可视为早期小管损伤生物标志物^[97]。Assal 等^[98]同样认为尿 NAG 是检测糖尿病患者早期损害最敏感的生物标志物。根据两项研究的结果，NAG 在评估肾小管间质损伤方面表现出一定的预测能力，AUC 分别为 0.636^[82]和 0.783^[99]。56 例 DN 患者和 20 例健康对照涉及的研究中，与对照组相比，在正常白蛋白尿 DN 患者中，血清胱抑素 C 水平、尿液 NAG 活性升高。另外微量白蛋白尿 DN 患者中，尿乳酸氢酶和碱性磷酸酶活性也升高。且血清胱抑素 C、尿 NAG、乳酸氢酶、碱性磷酸酶活性与血清肌酐水平呈正相关，与肌酐清除率负相关。表明测量血清胱抑素 C 水平和尿 NAG、乳酸氢酶和碱性磷酸酶活性可作为糖尿病患者肾小球和肾小管功能障碍的筛查标志物^[94]。矛盾地，Ambade 等^[100]没有发现尿液 NAG 作为 DN 的早期生物标志物具有临床意义，NAG 与正常白蛋白尿、微量白蛋白尿和整体糖尿病患者尿白蛋白的相关系数，分别仅为 0.23、0.32 和 0.40，且正常白蛋白尿、微量白蛋白尿和 NAG 排泄增加的糖尿病患者的尿白蛋白与 NAG 的相关系数分别仅为 0.31、0.27 和 0.35，表明糖尿病病程与尿 NAG 排泄无相关性。

L-FABP

尿肝型脂肪酸结合蛋白 (Liver-Type Fatty Acid Binding Protein, L-

FABP) 是一种在人近端小管细胞细胞质中表达的低分子量蛋白质^[101], 在肝脏水平也有表达。在蛋白尿正常的 1 型糖尿病患者中发现尿 L-FABP 增加, 对微白蛋白尿和微白蛋白尿向高蛋白尿的进展具有预测作用^[102], 该蛋白被认为是诊断早期糖尿病肾病的有用生物标志物。事实上, 尿液中的 L-FABP 已被日本卫生福利部门认为是小管生物标志物^[101]。L-FABP 因子与 DN 的严重程度也有关。尿 L-FABP 值随着肾功能的下降而增加^[103]。尽管一些作者, 如 Chou 等, 不认为尿 L-FABP 在 2 型糖尿病患者中具有预测作用, 但也有研究认为尿 L-FABP 是 DN 进展的独立预测因子^[104]。尿 L-FABP 水平已被证明与 DN 进展相关。在 T1DM 患者中, 高水平的尿 L-FABP 可预测 DN 的发生和进展以及死亡率, 与蛋白尿的严重程度和其他既定危险因素无关^[105]。在另一项横断面和纵向分析中, 对 140 名 2 型糖尿病患者和 412 名健康对照受试者的尿 L-FABP 与糖尿病肾病严重程度的关系进行了研究。正常、微量或大量白蛋白尿患者的尿 L-FABP 水平依次升高, 而终末期肾病患者的尿 L-FABP 水平进一步升高。在纵向分析中, 高尿 L-FABP 水平与蛋白尿增加、进展为终末期肾病或诱导血液透析有关。表明尿 L-FABP 能准确反映 2 型糖尿病肾病的严重程度, 在蛋白尿正常的患者中其水平较高。此外, 高尿 L-FABP 水平与糖尿病肾病的进展有关^[101]。高尿 L-FABP 水平是 DN 进展的一个强大且独立的预测因子^[106]。

2.4 基于组学的 DKD 新型生物标志物

除了上述的生物标志物外, 还有大量的标志物表征小管损伤、肾小球滤过、系膜扩张、血管损伤和肾脏炎症。近年来, 随着人类基因组计划的开展和广泛应用, 转录组学、蛋白质组学、代谢组学等技术相继出现。组学测试是一种由多种分子测量组成的检测方法, 可以量化生物样品中存在的所有 RNA、蛋白质和代谢物。组学平台的优势在于, 它们不仅可以在短时间内测量肽或代谢物的全谱, 而且还可以产生大量无偏倚的数据, 可用于诊断、结果预测和治疗反应。生物信息学分析已经成为一种新方法, 用于识别许多疾病的新基因和早期诊断/预后生物标志物^[107-109]。因此, 这种基于平台的组学结合生物信息学方法, 近年来已成为生物标志物发现的有力工具。

蛋白质组学

蛋白质组学分析可以通过分析患者尿液、血液或肾组织样本来建立 DN 特异性生物标志物。目前研究和验证最多的是利用蛋白质组学方法,即基于毛细管电泳质谱分级的将 273 种尿肽的数据组合成一个综合评分(命名 CKD-273),该评分在预测新发蛋白尿具有很高的准确性。一项对 3600 名患有不同慢性肾病病因的患者进行的横断面研究中,该组合对慢性肾病的诊断显示出 85%的敏感性和 100%的特异性^[110]。一项 35 名 T1DM 或 T2DM 患者的前瞻性研究中,CKD-273 能够在实际发病前 5 年预测进展为大量蛋白尿^[111],另一项研究表明,CKD-273 能够预测蛋白尿的发展,而独立于预测 DN 发展或进展的任何其他肾脏生物标志物^[112]。最近,在一项针对 1014 名患有 T1DM 或 T2DM、基线 eGFR \geq 70 mL/min/1.73 m²且蛋白尿正常的患者的研究中,CKD-273 能够识别出在没有蛋白尿的情况下会发展为 eGFR $<$ 60 mL/min/1.76 m²的糖尿病患者,与年龄、血压和基线 eGFR 无关^[113]。Nishant M. Bhensdadia 团队通过对 8 例正常蛋白尿 2 型糖尿病患者的尿液进行液相色谱/质谱分析,以及 30 例患者尿液进行检测,以确定肾功能丧失的候选标记物尿结合珠蛋白。经 204 名尚未有明显肾脏疾病的 2 型糖尿病患者的尿液验证,尿结合珠蛋白被确定为预测早期肾功能衰退的生物标志物^[114]。

代谢组学

代谢组学是对低体重中间体和生物化学过程中体液的测量。它们已经成为发现肾脏疾病新生物标记物的另一个潜在工具。有关 DN 代谢组学的研究大多聚焦在脂质代谢产物,包括酯化和非酯化脂肪酸、磷脂,以及氨基酸代谢、肉碱和核苷酸代谢。多项研究已经确定了脂肪酸及其代谢产物与 DN 进展之间的潜在联系。其中一项研究表明,使用 GC-MS 分析了不同 DN 阶段 2 型糖尿病患者的血浆样本,在 DKD 早期,血浆中的几种非酯化脂肪酸增加,而酯化脂肪酸减少。非酯化和酯化脂肪酸可区分 T2DM 的蛋白尿阶段^[115]。在一项病例对照研究中,血清中棕榈酸、亚麻油酸、亚油酸和溶血磷脂酰胆碱的浓度升高与 DN 发作有关^[116]。在另一项针对 78 名糖尿病患者的研究中,通过对患者血清代谢产物的综合分析,探索对糖尿病肾病诊断具有高灵敏度和特异性的新血清生物标志物,19 种血清代谢物的组合可以区分患有大量蛋白尿的 DN 和没有蛋白尿的糖尿病患者。当从 19 种代谢产物中选择 5 种代谢产物并应用于多元逻辑回归模型时,

整个数据集诊断 DN 的 AUC 值为 0.927, 在交叉验证测试中为 0.880^[117]。另一项包括健康对照组和 T2DM 患者的研究表明, 这两个患者组的亮氨酸、二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇的血清代谢产物水平存在显著差异^[118]。代谢组学有关的 DN 的前瞻性研究很少。在一项针对 90 名 T2DM 患者的研究中, 尿液己糖、谷氨酰胺、酪氨酸、血浆丁烯酰基肉碱和组氨酸水平预测了蛋白尿的发展, 与基线蛋白尿、eGFR 和 RAS 阻断剂的使用无关^[119]。在一项由 1001 名糖尿病和慢性肾病患者组成研究种, 调整临床变量后, 代谢物 3-羟基异丁酸 (3-HIBA) 和 3-甲基巴豆甘氨酸的水平与 eGFR 斜率呈显著负相关, 而乌头酸和柠檬酸呈正相关。且 3-HIBA 水平和乌头酸水平分别与需要肾脏替代治疗的 ESKD 的较高和较低风险相关^[120]。

转录组学

随着生物信息技术的发展, 人们逐渐认识到人类疾病不是由单一的分子缺陷引起的, 而是由各种分子之间复杂的相互作用驱动的。这些相互作用的复杂性包括不同类型的信息, 从细胞分子水平的蛋白质-蛋白质相互作用到基因表达和调节、代谢和疾病途径以及药物-疾病关系的相关研究^[121]。作为一个快速发展的新领域, 网络医学结合了分子生物学和网络科学, 有望揭示人类疾病的病因, 并从根本上改变其诊断和治疗^[122]。基于转录组学结合网络医学的算法, 如蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI)^[123]、LASSO^[124]和加权共表达网络分析 (WGCNA)^[107], 也已成功用于研究癌症和其他慢性疾病如糖尿病肾病的诊断和治疗。

Liu 等^[125]通过 GEO 数据库结合 WGCNA 鉴定出 LUM 和 FMOD 具有诊断 DN 的潜在能力, 其 AUC 分别为 0.897 和 0.983。在 GSE30528 数据集中, 与 eGFR 的负相关 (R 分别为-0.658 和-0.628)。Zhou 等^[107]通过合并 GEO 的数据集结合 WGCNA 发现 CAV1、COL1A2、VWF、FN1 和 ITGB2 (AUC 均 >0.8) 存在诊断 DN 时具有优势。另有研究基于 WGCNA 分析, 鉴定出 5 个关键基因 FN1、SLC2A2、FABP1、EHHADH 和 PIPOX 与 DN 的进展相关, 尤其 FN1 在 DN 组表达上调, 可能作为 DN 的诊断标志物和治疗靶点^[126]。Zeng 等^[127]通过 PPI 网络结合 Cytoscape 确定了 20 个 hub 基因 ALB, ANXA1, APOH, C3, CCL19, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL15A1, COL6A3, CXCL6, DCN, EGF, HRG, KNG1, LUM, SERPINA3, SPARC, SRGN 和 TIMP1 可能是糖尿病肾小

管间质损伤的诊断标志物以及治疗靶点。另一项研究中, PPI 网络结合 Cytoscape MODE 插件模块识别, 发现补体级联相关的 7 个关键基因 C1QA、C1QB、C3、CFB、ITGB2、VSIG4 和 CLU 可能参与 DN 的发展, 可作为 DN 早期诊断和靶向治疗的新型生物标志物^[128]。Wang 等^[129]整合 4 个 DN 肾小球数据集, 结合 PPI 网络构建和 CIBERSORT 算法等, 鉴定 FN1 和 C3 可作为 DN 免疫相关的生物标志物。另外, 有研究 PPI 网络分析结合 LASSO, ssGSEA 等算法, 鉴定出 CCR2、CX3CR1 和 SELP 三个免疫相关基因以及其组合模型可以作为 DN 诊断标志物, 尤其三个因子的组合模型无论在训练数据、验证数据, 还是基于实验样本队列验证, AUC 均高达 1^[124]。

3 总结

尽管有大量研究报告了预测 DN 诊断和预后的潜在新型生物标志物, 但它们只是适度地提高了当前可用生物标志物的潜能。因此, 在日常临床实践中, eGFR 和蛋白尿的评估仍然是 DN 诊断和风险分层的基石。然而, eGFR 和蛋白尿作为预后生物标志物都有其局限性。考虑到 DN 是一种涉及多种病理生理机制的复杂疾病, 用于 DN 患者风险分层的生物标志物应包括来自 DN 疾病过程的多种病理生理机制的因素。因此多种生物标志物联合的实用性和效能似乎很有希望, 特别是考虑到蛋白质组学、转录组学和代谢组学等多组学的进步, 大数据的背景下, 多种联合标志物动态检查和多项联合检查, 捕捉疾病过程的生物蓝图, 使得预测能力增强, 似乎更有应用价值和前景。因此, 即使多重生物标志物可以提供更准确的 DN 预测生物标志物, 在临床上可能更实用, 但是全面的临床验证, 尤其多中心的队列验证是必要的。

参考文献

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183:109119.
2. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control[J]. BMJ, 2017, 356: j1018.

3. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6):884-895.
4. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(23):2285-2293.
5. Lin YC, Chang YH, Yang SY, et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease[J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 117(8):662-675.
6. DCCT/EDIC research group. Effect of intensive diabetes treatment on albuminuria in type 1 diabetes: long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(10):793-800.
7. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, et al. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74[J]. *Diabetes*, 2006, 55(6):1832-1839.
8. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, et al. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018, 25(2):121-132.
9. Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, et al. Clinical Manifestations of Kidney Disease Among US Adults With Diabetes, 1988-2014[J]. *JAMA*, 2016, 316(6):602-610.
10. Thomas B. The Global Burden of Diabetic Kidney Disease: Time Trends and Gender Gaps[J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(4):18.
11. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157:107843.
12. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States[J]. *Am J Kidney Dis*, 2019, 73(3 Suppl 1):A7-7A8.
13. Mazzucco G, Bertani T, Fortunato M, et al. Different patterns of renal damage in type 2 diabetes mellitus: a multicentric study on 393 biopsies[J].

- Am J Kidney Dis, 2002, 39(4):713-720.
14. Zheng S, Noonan WT, Metreveli NS, et al. Development of late-stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice[J]. Diabetes, 2004, 53(12):3248-3257.
 15. Pourshabanan P, Momeni A, Mahmoudnia L, et al. Effect of pioglitazone on decreasing of proteinuria in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(1):132-136.
 16. Hills CE, Squires PE. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(3):131-139.
 17. Jenkin KA, Verty AN, McAinch AJ, et al. Endocannabinoids and the renal proximal tubule: an emerging role in diabetic nephropathy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(11):2028-2031.
 18. Barutta F, Bruno G, Grimaldi S, et al. Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment[J]. Endocrine, 2015, 48(3):730-742.
 19. Sugahara M, Pak W, Tanaka T, et al. Update on diagnosis, pathophysiology, and management of diabetic kidney disease[J]. Nephrology (Carlton), 2021, 26(6):491-500.
 20. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Muros-de-Fuentes M, et al. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2015, 2015:948417.
 21. Alicic RZ, Johnson EJ, Tuttle KR. Inflammatory Mechanisms as New Biomarkers and Therapeutic Targets for Diabetic Kidney Disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2018, 25(2):181-191.
 22. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury[J]. Kidney Int, 2004, 65(1):116-128.
 23. Shahzad K, Bock F, Dong W, et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2015, 87(1):74-84.

24. Barrera-Chimal J, Jaisser F. Pathophysiologic mechanisms in diabetic kidney disease: A focus on current and future therapeutic targets[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22 Suppl 1:16-31.
25. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(1):49-59.
26. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3):433-442.
27. Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 2003, 52(5):605-608.
28. Bertani T, Abbate M, Zoja C, et al. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit[J]. *Am J Pathol*, 1989, 134(2):419-430.
29. Kalantarinia K, Awad AS, Siragy HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF-alpha increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats[J]. *Kidney Int*, 2003, 64(4):1208-1213.
30. Donate-Correa J, Tagua VG, Ferri C, et al. Pentoxifylline for Renal Protection in Diabetic Kidney Disease. A Model of Old Drugs for New Horizons[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(3).
31. Navarro JF, Mora C, Muros M, et al. Additive antiproteinuric effect of pentoxifylline in patients with type 2 diabetes under angiotensin II receptor blockade: a short-term, randomized, controlled trial[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(7):2119-2126.
32. Boels M, Koudijs A, Avramut MC, et al. Systemic Monocyte Chemoattractant Protein-1 Inhibition Modifies Renal Macrophages and Restores Glomerular Endothelial Glycocalyx and Barrier Function in Diabetic Nephropathy[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(11):2430-2440.
33. Chang TT, Chen JW. The Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Diabetic Nephropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9).

34. Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): F697-701.
35. Titan SM, Vieira JM Jr, Dominguez WV, et al. Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26(6):546-553.
36. Park J, Ryu DR, Li JJ, et al. MCP-1/CCR2 system is involved in high glucose-induced fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(3):F749-757.
37. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124(3):139-152.
38. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, et al. Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(12):2987-2996.
39. Wada T, Furuichi K, Sakai N, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2000, 58(4):1492-1499.
40. Du Q, Fu YX, Shu AM, et al. Loganin alleviates macrophage infiltration and activation by inhibiting the MCP-1/CCR2 axis in diabetic nephropathy[J]. *Life Sci*, 2021, 272:118808.
41. Sumagin R, Sarelius IH. TNF-alpha activation of arterioles and venules alters distribution and levels of ICAM-1 and affects leukocyte-endothelial cell interactions[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(5):H2116-2125.
42. Sucaskey P, Balachandran K, Elhammali A, et al. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2):254-260.
43. Heidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease[J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4 Suppl 1):S100-106.

44. Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, 52(10):2586-2593.
45. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, et al. Baseline markers of inflammation are associated with progression to macroalbuminuria in type 1 diabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(8):2317-2323.
46. Skupien J, Warram JH, Niewczas MA, et al. Synergism between circulating tumor necrosis factor receptor 2 and HbA(1c) in determining renal decline during 5-18 years of follow-up in patients with type 1 diabetes and proteinuria[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(9):2601-2608.
47. Currie G, McKay G, Delles C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future[J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(6):763-776.
48. Narita T, Sasaki H, Hosoba M, et al. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5):1176-1181.
49. Kanauchi M, Akai Y, Hashimoto T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury[J]. *Eur J Intern Med*, 2002, 13(3):190-193.
50. Kazumi T, Hozumi T, Ishida Y, et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 1999, 22(7):1176-1180.
51. Banu N, Hara H, Okamura M, et al. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1995, 29(1):57-67.
52. Tamsma JT, van den Born J, Bruijn JA, et al. Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane[J]. *Diabetologia*, 1994, 37(3):313-320.
53. Fiseha T. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2

- diabetic patients[J]. *Biomark Res*, 2015, 3:16.
54. Kotajima N, Kimura T, Kanda T, et al. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *J Diabetes Complications*, 2000, 14(1):13-17.
55. Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, et al. Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetic Renal Disease Study Group[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(22):1636-1642.
56. Takizawa H, Satoh T, Kurusu A, et al. Increase of urinary type IV collagen in normoalbuminuric patients with impaired glucose tolerance[J]. *Nephron*, 1998, 79(4):474-475.
57. Okonogi H, Nishimura M, Utsunomiya Y, et al. Urinary type IV collagen excretion reflects renal morphological alterations and type IV collagen expression in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Clin Nephrol*, 2001, 55(5):357-364.
58. Tan Y, Yang Y, Zhang Z, et al. Urinary type IV collagen: a specific indicator of incipient diabetic nephropathy[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115(3):389-394.
59. Kado S, Aoki A, Wada S, et al. Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1996, 31(1-3):103-108.
60. Durvasula RV, Shankland SJ. Podocyte injury and targeting therapy: an update[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(1):1-7.
61. Akankwasa G, Jianhua L, Guixue C, et al. Urine markers of podocyte dysfunction: a review of podocalyxin and nephrin in selected glomerular diseases[J]. *Biomark Med*, 2018, 12(8):927-935.
62. Wang R, Yao C, Liu F. Association between Renal Podocalyxin Expression and Renal Dysfunction in Patients with Diabetic Nephropathy: A Single-Center, Retrospective Case-Control Study[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:7350781.
63. Mise K, Hoshino J, Ueno T, et al. Prognostic Value of Tubulointerstitial

- Lesions, Urinary N-Acetyl- β -d-Glucosaminidase, and Urinary β 2-Microglobulin in Patients with Type 2 Diabetes and Biopsy-Proven Diabetic Nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(4):593-601.
64. Zeni L, Norden A, Cancarini G, et al. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease[J]. J Nephrol, 2017, 30(6):701-717.
65. Zeng M, Liu J, Yang W, et al. Identification of key biomarkers in diabetic nephropathy via bioinformatic analysis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(5):8676-8688.
66. Bonventre JV. Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes? [J]. Semin Nephrol, 2012, 32(5):452-462.
67. Yu SM, Bonventre JV. Acute Kidney Injury and Progression of Diabetic Kidney Disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2018, 25(2):166-180.
68. Guo Y, Ran Z, Zhang Y, et al. Marein ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting renal sodium glucose transporter 2 and activating the AMPK signaling pathway in db/db mice and high glucose-treated HK-2 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131:110684.
69. Long YS, Zheng S, Kralik PM, et al. Impaired Albumin Uptake and Processing Promote Albuminuria in OVE26 Diabetic Mice[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016:8749417.
70. Xiao L, Wang M, Yang S, et al. A glimpse of the pathogenetic mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling in diabetic nephropathy[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:987064.
71. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2):212-222.
72. Khanijou V, Zafari N, Coughlan MT, et al. Review of potential biomarkers of inflammation and kidney injury in diabetic kidney disease[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2022, 38(6): e3556.
73. Coca SG, Nadkarni GN, Huang Y, et al. Plasma Biomarkers and Kidney Function Decline in Early and Established Diabetic Kidney Disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(9):2786-2793.
74. Schrauben SJ, Shou H, Zhang X, et al. Association of Multiple Plasma

-
- Biomarker Concentrations with Progression of Prevalent Diabetic Kidney Disease: Findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(1):115-126.
75. Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackbourn L, et al. Comparison of serum and urinary biomarker panels with albumin/creatinine ratio in the prediction of renal function decline in type 1 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(4):788-798.
76. Colombo M, Looker HC, Farran B, et al. Serum kidney injury molecule 1 and β 2-microglobulin perform as well as larger biomarker panels for prediction of rapid decline in renal function in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(1):156-168.
77. Colombo M, Valo E, McGurnaghan SJ, et al. Biomarker panels associated with progression of renal disease in type 1 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(9):1616-1627.
78. Looker HC, Colombo M, Hess S, et al. Biomarkers of rapid chronic kidney disease progression in type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4):888-896.
79. Bjornstad P, Pyle L, Cherney D, et al. Plasma biomarkers improve prediction of diabetic kidney disease in adults with type 1 diabetes over a 12-year follow-up: CACTI study[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(7):1189-1196.
80. Panduru NM, Sandholm N, Forsblom C, et al. Kidney injury molecule-1 and the loss of kidney function in diabetic nephropathy: a likely causal link in patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(6):1130-1137.
81. Fufaa GD, Weil EJ, Nelson RG, et al. Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetologia*, 2015, 58(1):188-198.
82. Qin Y, Zhang S, Shen X, et al. Evaluation of urinary biomarkers for prediction of diabetic kidney disease: a propensity score matching analysis[J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2019, 10:2042018819891110.
83. Kim MK, Yun KJ, Chun HJ, et al. Clinical utility of serum beta-2-
-

- microglobulin as a predictor of diabetic complications in patients with type 2 diabetes without renal impairment[J]. *Diabetes Metab*, 2014, 40(6):459-465.
84. Chen H, Li H. Clinical Implication of Cystatin C and β 2-Microglobulin in Early Detection of Diabetic Nephropathy[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2):241-247.
85. Foster MC, Inker LA, Hsu CY, et al. Filtration markers as predictors of ESRD and mortality in Southwestern American Indians with type 2 diabetes[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 66(1):75-83.
86. de Carvalho JA, Tatsch E, Hausen BS, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes[J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(3):232-236.
87. Yürük Yıldırım Z, Nayır A, Yılmaz A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as an Early Sign of Diabetic Kidney Injury in Children[J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2015, 7(4):274-279.
88. Lacquaniti A, Donato V, Pintaudi B, et al. "Normoalbuminuric" diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL[J]. *Acta Diabetol*, 2013, 50(6):935-942.
89. Jeon YK, Kim MR, Huh JE, et al. Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(2):258-263.
90. Rao X, Wan M, Qiu C, et al. Role of cystatin C in renal damage and the optimum cut-off point of renal damage among patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3):887-892.
91. Garg V, Kumar M, Mahapatra HS, et al. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19(5):895-900.
92. Kim SS, Song SH, Kim IJ, et al. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(3):656-661.
93. Comper WD, Osicka TM, Jerums G. High prevalence of immuno-unreactive intact albumin in urine of diabetic patients[J]. *Am J Kidney Dis*,

- 2003, 41(2):336-342.
94. Uslu S, Efe B, Alataş O, et al. Serum cystatin C and urinary enzymes as screening markers of renal dysfunction in diabetic patients[J]. *J Nephrol*, 2005, 18(5):559-567.
95. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, et al. Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(11):1890-1896.
96. Venkatesan A, Roy A, Kulandaivel S, et al. p-Coumaric Acid Nanoparticles Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating mRNA Expression of KIM-1 and GLUT-2 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats[J]. *Metabolites*, 2022, 12(12).
97. Lou W, Cheng Q, Liang Y, et al. Urinary N-Acetyl-β-d-Glucosaminidase (NAG) Levels and Risk of Cardiovascular Events in Diabetic Patients[J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14:10495-10502.
98. Assal HS, Tawfeek S, Rasheed EA, et al. Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus[J]. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*, 2013, 6:7-13.
99. Chen J, Zhang WW, Chen KH, et al. Urinary DcR2 is a novel biomarker for tubulointerstitial injury in patients with diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(2): F273-273F281.
100. Ambade V, Sing P, Somani BL, et al. Urinary N-acetyl beta glucosaminidase and gamma glutamyl transferase as early markers of diabetic nephropathy[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2006, 21(2):142-148.
101. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, et al. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(3):691-696.
102. Torigoe K, Muta K, Tsuji K, et al. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Predicts Residual Renal Function Decline in Patients on Peritoneal Dialysis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e928236.
103. Viswanathan V, Sivakumar S, Sekar V, et al. Clinical significance of

- urinary liver-type fatty acid binding protein at various stages of nephropathy[J]. *Indian J Nephrol*, 2015, 25(5):269-273.
104. Chou KM, Lee CC, Chen CH, et al. Clinical value of NGAL, L-FABP and albuminuria in predicting GFR decline in type 2 diabetes mellitus patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54863.
105. Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(6):1320-1324.
106. Panduru NM, Forsblom C, Saraheimo M, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(7):2077-2083.
107. Zhou H, Yang Z, Mu L, et al. Integrated Analysis of Multiple Microarray Studies to Identify Core Gene-Expression Signatures Involved in Tubulointerstitial Injury in Diabetic Nephropathy[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022:9554658.
108. Tang M, Li Y, Luo X, et al. Identification of Biomarkers Related to CD8+ T Cell Infiltration with Gene Co-expression Network in Lung Squamous Cell Carcinoma[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:606106.
109. Zhou S, Lu H, Xiong M. Identifying Immune Cell Infiltration and Effective Diagnostic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis by Bioinformatics Analysis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:726747.
110. Good DM, Zürbig P, Argilés A, et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(11):2424-2437.
111. Zürbig P, Jerums G, Hovind P, et al. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2012, 61(12):3304-3313.
112. Roscioni SS, de Zeeuw D, Hellemons ME, et al. A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(2):259-267.
113. Zürbig P, Mischak H, Menne J, et al. CKD273 Enables Efficient Prediction of Diabetic Nephropathy in Nonalbuminuric Patients[J].

- Diabetes Care, 2019, 42(1): e4-4e5.
114. Bhensdadia NM, Hunt KJ, Lopes-Virella MF, et al. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6):1136-1143.
115. Han LD, Xia JF, Liang QL, et al. Plasma esterified and non-esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography-mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 689(1):85-91.
116. Zhang H, Zuo JJ, Dong SS, et al. Identification of Potential Serum Metabolic Biomarkers of Diabetic Kidney Disease: A Widely Targeted Metabolomics Study[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020:3049098.
117. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, et al. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(10):3101-3109.
118. Zhang J, Yan L, Chen W, et al. Metabonomics research of diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus based on UPLC-oeTOF-MS system[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 650(1):16-22.
119. Pena MJ, Lambers Heerspink HJ, Hellemons ME, et al. Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with Type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabet Med*, 2014, 31(9):1138-1147.
120. Kwan B, Fuhrer T, Zhang J, et al. Metabolomic Markers of Kidney Function Decline in Patients with Diabetes: Evidence from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(4):511-520.
121. Conte F, Fiscon G, Licursi V, et al. A paradigm shifts in medicine: A comprehensive review of network-based approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(6):194416.
122. Silverman EK, Schmidt H, Anastasiadou E, et al. Molecular networks in Network Medicine: Development and applications[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2020, 12(6): e1489.

123. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-605D612.
124. Zhou H, Mu L, Yang Z, et al. Identification of a novel immune landscape signature as effective diagnostic markers related to immune cell infiltration in diabetic nephropathy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1113212.
125. Feng S, Gao Y, Yin D, et al. Identification of Lumican and Fibromodulin as Hub Genes Associated with Accumulation of Extracellular Matrix in Diabetic Nephropathy[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2021, 46(3):275-285.
126. Gholaminejad A, Fathalipour M, Roointan A. Comprehensive analysis of diabetic nephropathy expression profile based on weighted gene co-expression network analysis algorithm[J]. *BMC Nephrol*, 2021, 22(1):245.
127. Zeng M, Liu J, Yang W, et al. Multiple-microarray analysis for identification of hub genes involved in tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9):16447-16462.
128. Xu B, Wang L, Zhan H, et al. Investigation of the Mechanism of Complement System in Diabetic Nephropathy via Bioinformatics Analysis[J]. *J Diabetes Res*, 2021, 2021:5546199.
129. Wang Y, Zhao M, Zhang Y. Identification of fibronectin 1 (FN1) and complement component 3 (C3) as immune infiltration-related biomarkers for diabetic nephropathy using integrated bioinformatic analysis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):5386-5401.