

# 基于转录组测序分析转化生长因子- $\beta$ 1诱导肾纤维化机制

李华男<sup>1</sup>, 李佩芬<sup>1</sup>, 李善义<sup>1</sup>, 张雪莹<sup>1</sup>, 董欣茹<sup>1</sup>, 杨 明<sup>2</sup>, 沈维干<sup>1</sup>

1. 扬州大学医学院细胞生物学教研室 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225009

2. 扬州大学附属医院肾内科, 江苏 扬州 225009

**[摘 要]** **目的:**探究转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)诱导肾纤维化的机制。**方法:**将TGF- $\beta$ 1处理和未处理的肾成纤维细胞NRK-49F进行转录组测序,采用DESeq2分析测序结果,以错误发现率低于0.05且 $\log_2$ FC绝对值大于1为标准筛选差异表达的基因,并对差异表达的基因进行基因本体(GO)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。进一步筛选差异表达基因中编码转录因子的基因,并利用单侧输尿管梗阻诱导的小鼠肾纤维化模型和高通量基因表达数据库GSE104954数据集对这些基因在肾纤维化过程中的表达进行验证。**结果:**TGF- $\beta$ 1处理6、12和24 h后,分别有552、1209和1028个差异表达基因。GO分析表明,这些差异表达基因在发育、细胞死亡和细胞迁移过程中显著富集。KEGG分析显示,在TGF- $\beta$ 1诱导早期(TGF- $\beta$ 1处理6 h)主要表现为Hippo、TGF- $\beta$ 、Wnt信号通路的变化,而在TGF- $\beta$ 1诱导晚期(TGF- $\beta$ 1处理24 h)主要表现为细胞外基质受体相互作用、局灶黏附和黏附分子连接等相关通路的改变。在TGF- $\beta$ 1处理6 h时291个上调的差异表达基因中,*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Ahr*、*Foxo1*、*Myc*、*Tcf7*、*Foxc2*、*Glis1*等13个基因编码转录因子。在细胞模型中验证发现,TGF- $\beta$ 1可以诱导其中9个编码转录因子基因(*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Myc*、*Tcf7*)的表达,其余4个基因的表达水平在TGF- $\beta$ 1处理后无显著变化。在动物模型验证中发现,*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Myc*和*Tcf7*显著上调,而*Vdr*显著下调,*Lef1*无显著变化。在GSE104954数据集中验证发现,*IRF8*在糖尿病肾病患者和IgA肾病患者的肾小管间质中显著高表达,*MYC*在糖尿病肾病患者中高表达,而其他7个基因的表达产物与对照组相似。**结论:**TGF- $\beta$ 1诱导肾成纤维细胞基因差异表达,*Irf8*和*Myc*可能是慢性肾脏病和肾纤维化的潜在靶点。



收稿日期(Received):2022-11-28 接受日期(Accepted):2023-08-24 网络预发表日期(Online):2023-09-28

基金项目(Funding):国家自然科学基金(32100911);江苏省高等学校自然科学研究项目(20KJB310002);2019江苏省双创博士项目;2020年扬州市“绿扬金凤计划”

第一作者(First author):李华男,讲师,硕士生导师,主要从事肾纤维化发病机制的研究;E-mail: hnli@yzu.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-1976-2895

通信作者(Corresponding author):沈维干,教授,博士生导师,主要从事肿瘤和肾纤维化发病机制的研究;E-mail: shenweigan@hotmail.com;https://orcid.org/0000-0001-9978-4551

[关键词] 转录组; 转化生长因子- $\beta$ 1; 成纤维细胞; 肾纤维化; 机制; 小鼠

[中图分类号] R34 [文献标志码] A

## Mechanism of transforming growth factor- $\beta$ 1 induce renal fibrosis based on transcriptome sequencing analysis

LI Huanan<sup>1</sup>, LI Peifen<sup>1</sup>, LI Shanyi<sup>1</sup>, ZHANG Xueying<sup>1</sup>, DONG Xinru<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>2</sup>, SHEN Weigan<sup>1</sup> (1. Department of Cell Biology, School of Medicine, Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China; 2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Corresponding author: SHEN Weigan, E-mail: shenweigan@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9978-4551>

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) induce renal fibrosis. **Methods:** Renal fibroblast NRK-49F cells treated with and without TGF- $\beta$ 1 were subjected to RNA-seq analysis. DESeq2 was used for analysis. Differentially expressed genes were screened with the criteria of false discovery rate < 0.05 and  $|\log_2FC| > 1$ . Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed for differentially expressed genes. Genes encoding transcription factors were further screened for differential expression genes. Then, the expression of these genes during renal fibrosis was verified using unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced mouse renal fibrosis model and a public gene expression dataset (GSE104954). **Results:** After TGF- $\beta$ 1 treatment for 6, 12 and 24 h, 552, 1209 and 1028 differentially expressed genes were identified, respectively. GO analysis indicated that these genes were significantly enriched in development, cell death, and cell migration. KEGG pathway analysis showed that in the early stage of TGF- $\beta$ 1 induction (TGF- $\beta$ 1 treatment for 6 h), the changes in Hippo, TGF- $\beta$  and Wnt signaling pathways were observed, while in the late stage of TGF- $\beta$ 1 induction (TGF- $\beta$ 1 treatment for 24 h), the changes of extracellular matrix-receptor interaction, focal adhesion and adherens junction were mainly enriched. Among the 291 up-regulated differentially expressed genes treated with TGF- $\beta$ 1 for 6 h, 13 genes (*Snai1*, *Irf8*, *Bhlhe40*, *Junb*, *Arid5a*, *Vdr*, *Lef1*, *Ahr*, *Foxo1*, *Myc*, *Tcf7*, *Foxc2*, *Glis1*) encoded transcription factors. Validation in a cell model showed that TGF- $\beta$ 1 induced expression of 9 transcription factors (encoded by *Snai1*, *Irf8*, *Bhlhe40*, *Junb*, *Arid5a*, *Vdr*, *Lef1*, *Myc*, *Tcf7*), while the expression levels of the other 4 genes did not significantly change after TGF- $\beta$ 1 treatment. Validation results in UUO-induced mouse renal fibrosis model showed that *Snai1*, *Irf8*, *Bhlhe40*, *Junb*, *Arid5a*, *Myc* and *Tcf7* were up-regulated after UUO, *Vdr* was down-regulated and there was no significant change in *Lef1*. Validation based on the GSE104954 dataset showed that *IRF8* was significantly overexpressed in the renal tubulointerstitium of patients with diabetic nephropathy or IgA nephropathy, *MYC* was highly expressed in diabetic nephropathy, and the expressions of the other 7 genes were not significantly different compared with the

control group. **Conclusion:** TGF- $\beta$ 1 induces differentially expressed genes in renal fibroblasts, among which *Irf8* and *Myc* were identified as potential targets of chronic kidney disease and renal fibrosis.

[ **Key words** ] Transcriptome; Transforming growth factor- $\beta$ 1; Fibroblasts; Renal fibrosis; Mechanism; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2023, 52(5): 594-604.]

[ **缩略语** ] 细胞外基质(extracellular matrix, ECM); 转化生长因子(transforming growth factor, TGF); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 定量逆转录PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 错误发现率(false discovery rate, FDR); 倍数变化(fold change, FC); 基因本体(Gene Ontology, GO); 京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG); 单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO); 蜗牛家族转录抑制因子(Snail family transcriptional repressor, Snai); 干扰素调节因子(interferon regulatory factor, Irf); 基本螺旋-环-螺旋家族成员 e40(basic helix-loop-helix family member e40, Bhlhe40); 富含AT的交互式含域蛋白5A(AT-rich interactive domain 5A, Arid5a); 维生素D受体(vitamin D receptor, Vdr); 淋巴增强结合因子(lymphoid enhancer binding factor, Lef); 芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, Ahr); 叉头框-O1(forkhead box O1, FoxO1); 转录因子(transcription factor, Tcf); 叉头框-C2(forkhead box C2, FoxC2); GLIS家族锌指蛋白(GLIS family zinc finger, Glis); 辅助性T细胞(helper T cell, Th细胞)

肾纤维化是许多进行性肾脏疾病的共同表现,其特征是正常组织结构逐渐被ECM(如胶原、蛋白聚糖和糖蛋白)所取代<sup>[1-2]</sup>,直接原因是间质成纤维细胞增殖并分化为肌成纤维细胞,导致ECM过度合成<sup>[3]</sup>。Kuppe等<sup>[4]</sup>通过单细胞转录组测序发现,血小板源生长因子受体 $\alpha$ 阳性且血小板源生长因子受体 $\beta$ 阳性的成纤维细胞/肌成纤维细胞是人肾纤维化瘢痕形成的主要来源。TGF- $\beta$ 1是一种多功能的细胞因子,是促进成纤维细胞分化为促纤维化表型和产生ECM的主要介质<sup>[5-6]</sup>。通过多种途径靶向TGF- $\beta$ 1可抑制肾纤维化,部分靶向药物已用于临床研究<sup>[7-9]</sup>。然而,TGF- $\beta$ 1不仅参与纤维化过程,还参与炎症反应、免疫调节等,直接阻断TGF- $\beta$ 1信号通路可能带来诸多副作用,限制了其作为一种抗纤维化治疗方法在临床上的应用<sup>[7-9]</sup>。因此,了解TGF- $\beta$ 1诱导纤维化的机制和TGF- $\beta$ 1信号通路下游的效应分子将有助于探索预防和抑制肾纤维化的方法。

TGF- $\beta$ 1诱导的正常大鼠肾成纤维细胞NRK-49F是典型的体外肾纤维化细胞模型。Zhou

等<sup>[10]</sup>采用质谱法对TGF- $\beta$ 1处理48 h的NRK-49F细胞和对照细胞的细胞裂解物及条件培养基在蛋白质组水平进行分析。与对照组比较,在NRK-49F细胞的细胞裂解物中鉴定出628种差异表达的蛋白质,在条件培养基中鉴定出62种差异表达的蛋白质。TGF- $\beta$ 1调节的细胞裂解物蛋白表现为核糖体蛋白增加,参与多种代谢途径的蛋白质失调,包括醛脱氢酶3家族成员A1减少、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1和肌苷单磷酸脱氢酶2增加;酶联免疫吸附试验结果显示,TGF- $\beta$ 1处理组胶原降解调节因子(丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族E成员1增加、基质金属蛋白酶3减少)、胶原交联因子(前胶原-赖氨酸、2-氧葡萄糖酸5-双加氧酶2增加)、信号分子(细胞通信网络因子1、细胞通信网络因子2和Tsukushi增加,细胞通信网络因子3减少)和趋化因子(C-C基序趋化因子配体2、C-C基序趋化因子配体7增加)的分泌异常<sup>[10]</sup>。然而,由于转录和翻译的调控作用,基因在转录水平与翻译水平的表达可能存在差异。TGF- $\beta$ 1作用于成纤维细胞不同时间后基因

的表达可能不同,TGF- $\beta$ 1 仅处理 48 h 可能会丢失一些早期表达的差异基因;此外,由于基因的表达经历先转录后翻译的过程,蛋白质组比转录组提供的诊断信息晚<sup>[11]</sup>。因此,上述研究在寻找 TGF- $\beta$ 1 信号通路下游的潜在靶点上存在局限性<sup>[10]</sup>。本研究使用转录组测序技术检测了 TGF- $\beta$ 1 处理 6、12 和 24 h 的 NRK-49F 细胞转录组,汇总了表达上调和下调的基因、差异表达基因参与的生物过程和信号通路,并采用 qRT-PCR 在动物模型和数据库慢性肾脏病患者的转录组数据中进行验证,为更好地理解 TGF- $\beta$ 1 诱导的肾纤维化机制以及研发新的诊断和治疗方案提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、动物、试剂和仪器

正常大鼠肾成纤维细胞株 NRK-49F 购自中国科学院细胞库。8 周龄 C57B/L6 小鼠(体重约 20 g)购自扬州大学比较医学中心,动物在通风、室温为 24 °C 的动物房中饲养,进行 12 h 光照、12 h 黑暗的循环,所有动物均可自由获得食物和水。动物实验方案通过扬州大学医学院伦理委员会审查(YXYLL-2021-05),符合美国国立卫生研究院发布的《实验动物护理和使用指南》。

DMEM/F12 培养基、胎牛血清为赛澳美细胞技术(北京)有限公司产品;青霉素/链霉素为武汉赛维尔生物科技有限公司产品;重组小鼠/大鼠 TGF- $\beta$ 1 为北京义翘神州科技股份有限公司产品;TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品;戊巴比妥钠为北京方程生物科技有限公司产品;HiScript Q RT SuperMix 试剂盒和 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品。PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品;ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

### 1.2 细胞培养及处理

NRK-49F 细胞在含 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基中,置于 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱中培养。加入终浓度为 5 ng/mL 的 TGF- $\beta$ 1 处理 6、12 和 24 h 后收集细胞,同期收集未经 TGF- $\beta$ 1 处理的对照细胞。

### 1.3 转录组测序文库构建及测序

转录组测序文库构建及测序由武汉爱基百客生物科技有限公司完成,主要步骤如下:使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA,并使用 Qsep1

仪器评估所有 RNA 样品的完整性;取 3  $\mu$ g 总 RNA,采用 MGIEasy mRNA 文库制备试剂盒构建 RNA 文库(具体包括使用 Oligo-dT 磁珠分离 polyA 富集的 mRNA、mRNA 片段化、片段化的 mRNA 逆转录合成 cDNA、末端修复、加碱基 A 并连接测序接头);文库在 Illumina 测序平台(Illumina NovaSeq 6000)上使用武汉爱基百客生物科技有限公司的双末端技术进行测序。

### 1.4 转录组测序结果的生物信息学分析

**1.4.1 识别差异表达基因** 通过 Cutadapt 1.11 过滤出衔接子和低通量测序片段,然后使用 Hisat 2 2.1.0 将纯化的测序片段与大鼠参考基因组 RN6 进行比对<sup>[12-13]</sup>。将所有样本的比对信息使用 Stringtie 2.0.4 进行转录本重构。使用 RSEM 1.2.6 评估转录本的丰度,并将表达值标准化为 FPKM(每千个碱基的转录本每百万映射读取的片段数)<sup>[14]</sup>。差异表达基因用 DESeq2 进行鉴定,FDR 低于 0.05 且  $\log_2$ FC 绝对值大于 1 的基因作为差异有统计学意义的基因。使用 R 语言中的 ggplot2 包绘制火山图展示差异表达基因的分布,使用 Venn Diagram 包绘制维恩图展示 TGF- $\beta$ 1 处理 6、12 和 24 h 后差异表达的交集基因数,使用 pheatmap 包对差异表达基因进行层次聚类并绘制热图,展示组间差异和差异基因表达的动态变化。

**1.4.2 差异表达基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析** 使用 R 语言中的 ClusterProfiler 包对差异表达基因分别进行 GO 和 KEGG 通路富集分析<sup>[15-16]</sup>。按照 FDR 低于 0.05 筛选富集结果。

### 1.5 转录因子的筛选

根据美国国家生物技术信息中心在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的基因信息,在差异表达的基因中筛选编码转录因子的基因。

### 1.6 动物模型验证 TGF- $\beta$ 1 信号通路下游的转录因子

C57B/L6 小鼠在造模前禁食 8 h,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,无菌条件下剪开小鼠皮肤及肌层至腹膜后,通过中线切口暴露并游离左侧输尿管,并用 4-0 丝线在肾盂下方 5 mm 处结扎两次,建立 UUO 诱导的肾纤维化小鼠。手术对照组以类似方式处理,但不结扎输尿管。造模 7 d 后收取小鼠肾组织,去包膜,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。

1.7 通过数据集 GSE104954 验证 TGF-β1 信号通路下游的转录因子

为了进一步证实肾纤维化的潜在靶点,从高通量基因表达数据库中筛选 GSE104954 数据集,并在数据集中选择健康对照(活体捐献者)、糖尿病肾病患者和 IgA 肾病患者数据,使用 GEO2R 工具筛选上述数据集中糖尿病肾病患者和 IgA 肾病患者肾组织标本分别相对于健康对照肾组织标本间的差异表达基因,筛选条件为 FDR 低于 0.05 和 log<sub>2</sub>FC 绝对值大于 1。使用 Prism Graph 8.0 软件绘制相关转录因子的表达图谱。

1.8 qRT-PCR 检测相关基因的表达

使用 HiScript Q RT SuperMix 试剂盒将 1 μg 总 RNA 进行逆转录,合成 cDNA。使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行定量 PCR 检测。实验中所使用的引物见表 1。PCR 条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,进行 40 次扩增。使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行定量 PCR 检测,每个基因的表达量表示为 β-actin 的倍数,每组进行三次独立重复实验。

1.9 统计学方法

采用 Prism Graph 8.0 软件进行统计分析。计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组样本之间比较采用双侧 Student's *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β1 诱导的体外纤维化模型构建成功

qRT-PCR 结果显示,纤维化相

关基因 *Acta2*、*Col1a1* 和 *Col3a1* 的表达在 TGF-β1 处理后显著上调(图 1),提示 TGF-β1 诱导的体外纤维化细胞模型构建成功。

2.2 TGF-β1 诱导的差异表达基因

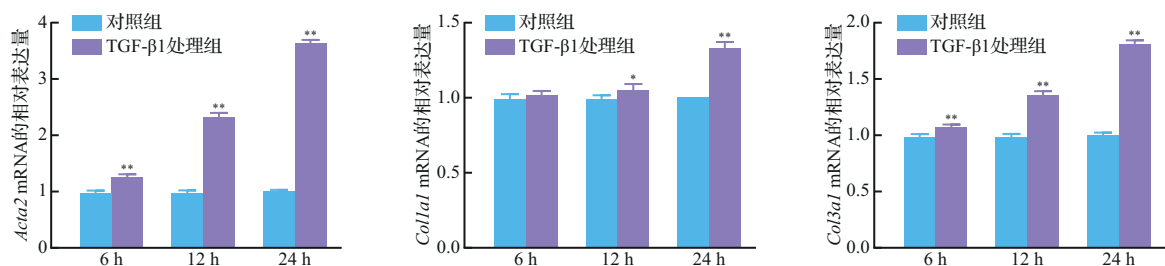
高通量转录组测序结果显示,与对照组比较,TGF-β1 处理 6 h 时有 552 个基因差异表达,其中 291 个基因表达上调,261 个基因表达下调;TGF-β1 处理 12 h 时有 1209 个基因差异表达,其中 363 个基因表达上调,846 个基因表达下调;TGF-β1 处理 24 h 时有 1028 个基因差异表达,其中 342 个基因表达上调,686 个基因表达下调(图 2)。将三个时间点的差异表达基因取交集,共有 207 个基因在 TGF-β1 处理 6、12 和 24 h 时均差异表达,其中 89 个基因在三个时间点均上调,110 个基因在三个时间点均下调(图 3)。聚类分析显示两

表 1 定量逆转录聚合酶链反应中所使用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

| 基 因            | 上游引物(5'-3')              | 下游引物(5'-3')            |
|----------------|--------------------------|------------------------|
| <i>Snai1</i>   | CCACTCGGATGTGAAGAGATAC   | AGACTCTTGCTTTTGTGGAG   |
| <i>Irf8</i>    | TGGACATTTCCGAGCCATAC     | TCAGCTCCTCGATCTCTGAA   |
| <i>Bhlhe40</i> | CTCCTACCCGAACATCTCAAAC   | TCTGCTGCTGCTGATCAATTA  |
| <i>Junb</i>    | CCTTTCTATCACGACGACTCATAC | CTAAGGTGGGTTTCAGGAGTTT |
| <i>Arid5a</i>  | GTTGGGACCACCTGGTAAAG     | GCTTTGGGCTTGGGATAGAA   |
| <i>Vdr</i>     | CTGAACGGAGAGGATTCTGATG   | GGATGCTGTAACGACAAGGT   |
| <i>Lef1</i>    | GAGAAAGGAACAGGAGCCTAAA   | CTACGACATTCCGCCCTCATT  |
| <i>Ahr</i>     | CAGTGTAGAGCACAAGTCAGAG   | GGATAGTGAAGACGCATAGAAG |
| <i>FoxO1</i>   | CGCCAAACACCACTCTAAATTC   | CTGTCCTGAAGTGTCTGCATAG |
| <i>Myc</i>     | AGCTTCGCTAACAGGAACATATG  | CTGCTGTTGCTGCTGATAGA   |
| <i>Tcf7</i>    | CTCGGACAAACTTCCAGAGTC    | GAGCAGATTGAAGGCAGAGTAG |
| <i>FoxC2</i>   | GGACGTGCCCAAGGATAAG      | GCTCTTGACCACCACTTTCT   |
| <i>Glis1</i>   | GTCTGTGAGAGACTGCTTCATT   | GGTAGGGCTTCTTGCTTGAT   |

Snai1: 蜗牛家族转录抑制因子;Irf: 干扰素调节因子;Bhlhe40: 基本螺旋-环-螺旋家族成员 e40;Arid5a: 富含 AT 的交互式含域蛋白 5A;Vdr: 维生素 D 受体;Lef: 淋巴增强结合因子;Ahr: 芳香烃受体;FoxO1: 叉头框-O1;Tcf: 转录因子;FoxC2: 叉头框-C2;Glis: GLIS 家族锌指蛋白。



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。TGF: 转化生长因子;ACTA: α-平滑肌肌动蛋白;COL1A1: I 型胶原 α1;COL3A1: III 型胶原 α1。

图 1 TGF-β1 处理组与对照组肾纤维化相关基因的 mRNA 表达

Figure 1 The mRNA expression of renal fibrosis-related genes in TGF-β1 treated group and the control group

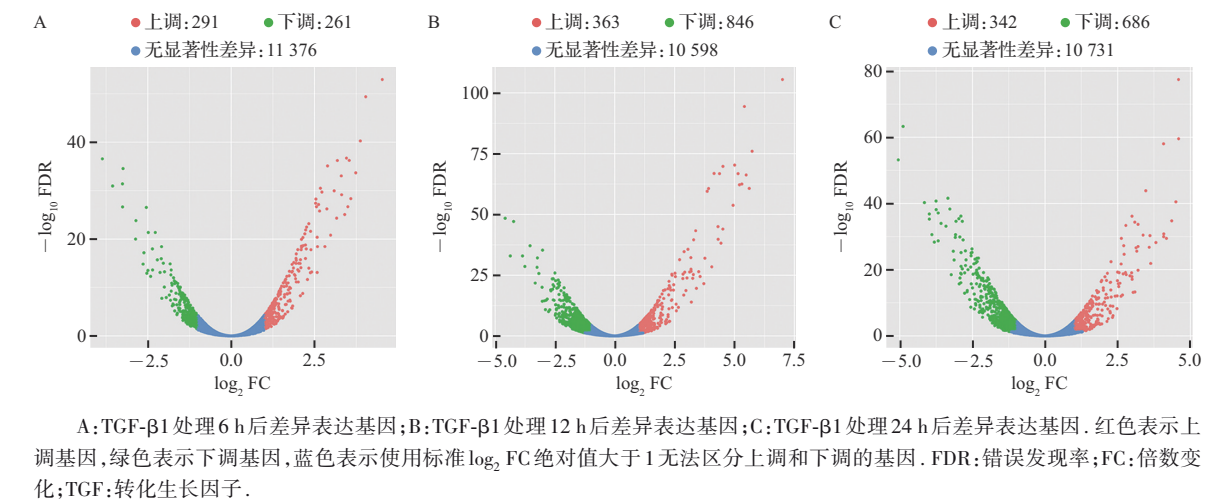


图2 TGF-β1 处理 6、12、24 h 后表达变化基因的火山图  
Figure 2 Volcano plot for the differentially expressed genes after TGF-β1 treated for 6, 12, 24 h

个主要分支,即对照组和 TGF-β1 处理组(图4)。以上结果表明,TGF-β1 处理后成纤维细胞中的基因表达出现变化,且与 TGF-β1 诱导的时间相关。

2.3 差异表达基因 GO 分析和KEGG分析结果

GO 分析结果显示,前二十个富集条目集中在生物过程上。其中, TGF-β1 处理 6 和 12 h 差异表达的基因主要富集在组织发育(tissue development)和小管发育(tube development),而 TGF-β1 处理 24 h 差异表达的基因主要富集在细胞迁移的调控(regulation of cell migration)。细胞死亡的调控(regulation of cell death)、细胞凋亡的调控(regulation of apoptotic process)和程序性细胞死亡的调控(regulation of programmed cell death)仅出现在 TGF-β1 处理 6 h 差异表达的基因中,而细胞对细胞因子刺激的反应(cellular response to cytokine stimulus)、对含氧化合物的反应(response to oxygen-containing compound)和对细胞因子的反应(response to cytokine)仅出现在 TGF-β1 处理 24 h 差异表达的基因,见图5。结果提示,TGF-β1 作用后,成纤维细胞中与差异表达基因相关的分子过程和生物途径发生改变,且与 TGF-β1 诱导的时间相关。

KEGG 富集分析结果显示,在 TGF-β1 诱导早

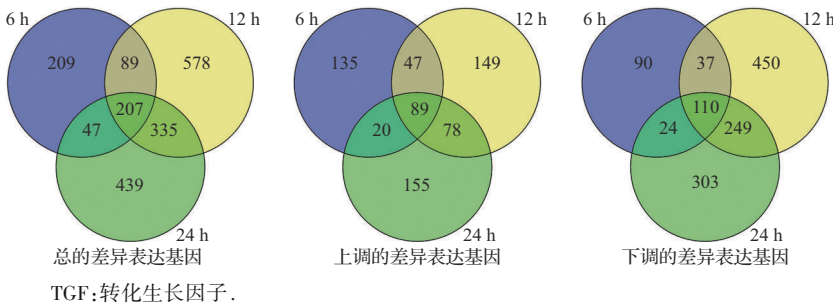


图3 TGF-β1 处理 6、12、24 h 后表达变化基因的维恩图  
Figure 3 Venn diagram of differentially expressed genes after TGF-β1 treated for 6, 12, 24 h

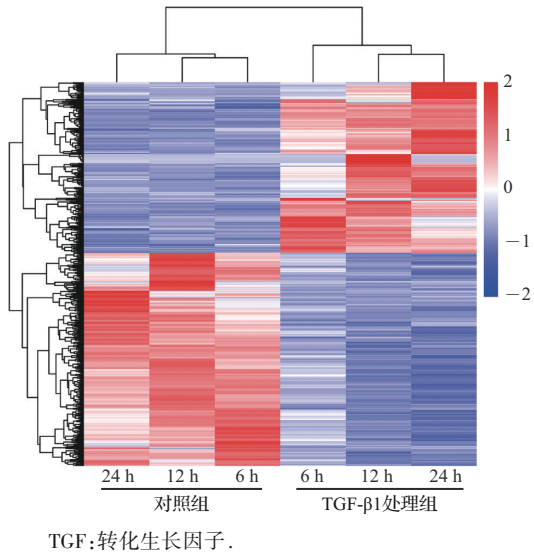
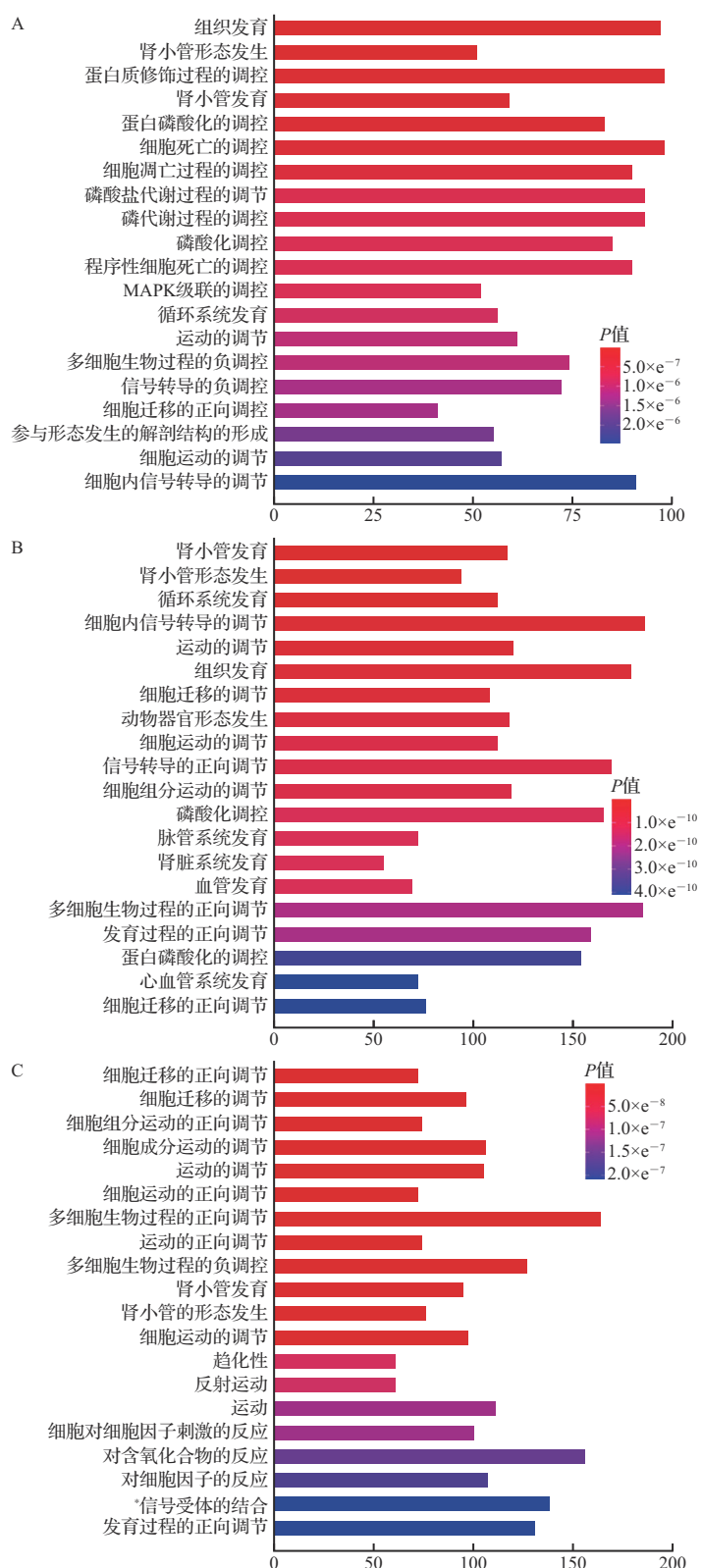


图4 TGF-β1 处理组与对照组基因表达分层聚类 and 热图  
Figure 4 Hierarchical clustering and heatmap showing the genes expression in TGF-β1 treated group and the control group



A: TGF-β1 处理 6 h 与同一时间对照组差异表达基因富集的前 20 条通路; B: TGF-β1 处理 12 h 与同一时间对照组差异表达基因的前 20 条通路; C: TGF-β1 处理 24 h 与同一时间对照组差异表达基因的前 20 条通路。TGF: 转化生长因子; GO: 基因本体。\* 表示分子功能, 其余为生物过程。

图 5 差异表达基因的 GO 分析结果

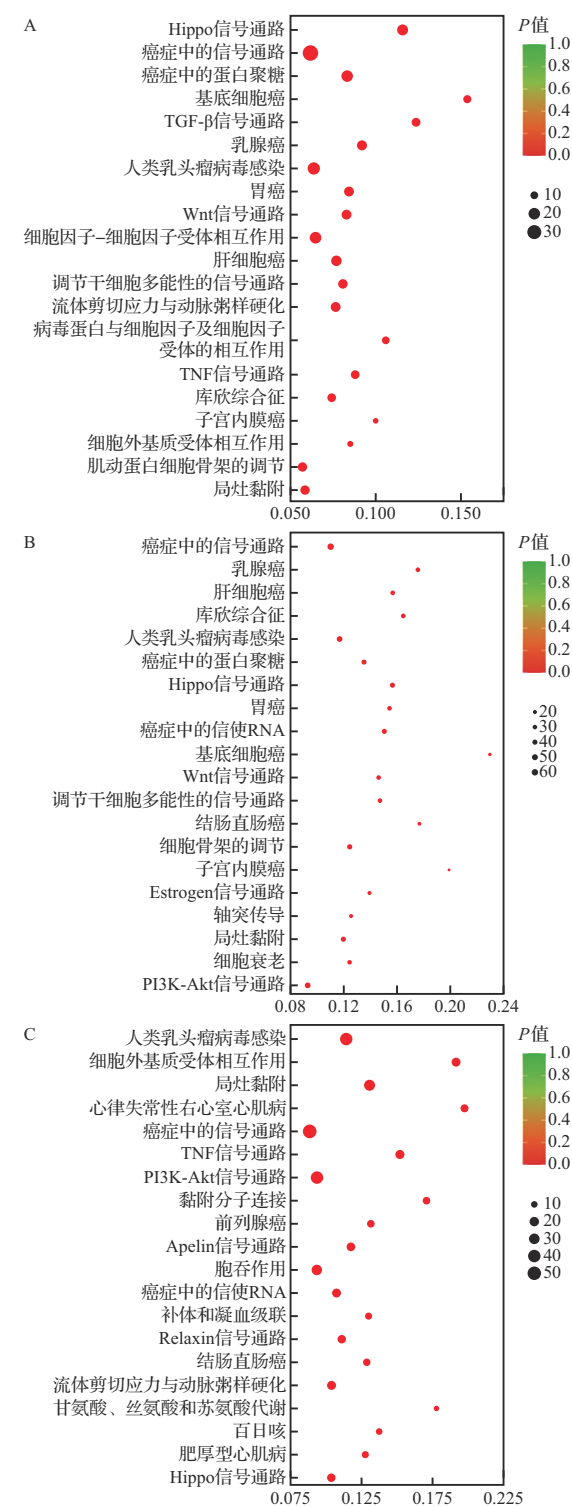
Figure 5 Results of GO analysis of differentially expressed genes

期(TGF-β1 处理 6 h)主要表现为 Hippo、TGF-β、Wnt 信号通路的变化,而在 TGF-β1 诱导晚期(TGF-β1 处理 24 h)主要表现为 ECM 受体相互作用、局灶黏附和黏附分子连接等相关通路的改变,见图 6。结果提示,TGF-β1 作用后,成纤维细胞中差异表达基因参与的信号通路发生改变,且与 TGF-β1 诱导的时间相关。

## 2.4 肾间质成纤维细胞中 TGF-β1 信号通路下游的转录因子

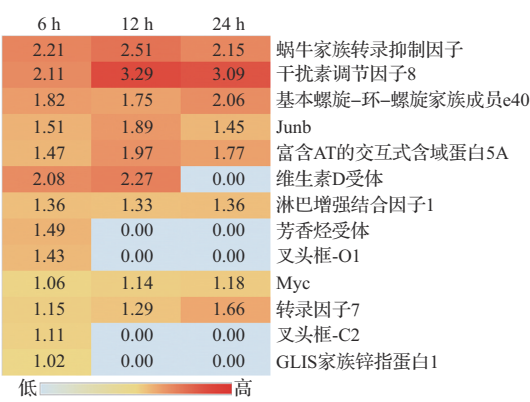
对 TGF-β1 处理 6 h 时差异表达基因中编码转录因子的基因进行筛选发现,影响上述生物过程和信号通路的基因主要集中在上调的基因中。在 TGF-β1 处理 6 h 时 291 个上调的差异表达基因中,*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Ahr*、*Foxo1*、*Myc*、*Tcf7*、*Foxc2*、*Glis1* 这 13 个基因可以编码转录因子,其中部分转录因子在 TGF-β1 处理 12、24 h 时较对照组也上调(图 7)。qRT-PCR 验证发现,在细胞模型中,TGF-β1 可以诱导其中 9 个编码转录因子基因(*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Myc*、*Tcf7*)的表达(图 8),其余 4 个基因的表达水平在 TGF-β1 处理后没有显著变化。在动物肾纤维化模型中,上述 9 个编码转录因子基因中 *Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Myc* 和 *Tcf7* 这 7 个编码转录因子基因显著上调,而 *Vdr* 显著下调,*Lef1* 没有变化,见图 9。

数据集 GSE104954 验证结果显示,*IRF8* 在糖尿病肾病患者( $1.149 \pm 0.119$ )和 IgA 肾病患者( $1.077 \pm 0.098$ )的肾小管间质中相比健康对照( $1.000 \pm 0.093$ )显著高表达(均  $P < 0.01$ ),*MYC* 在糖尿病肾病患者( $1.100 \pm 0.075$ )中相比健康对照( $1.000 \pm 0.088$ )高表达( $P < 0.01$ ),而



A: TGF-β1 处理 6 h 与同一时间对照组相比上调基因富集的前 20 条通路; B: TGF-β1 处理 12 h 与同一时间对照组相比上调基因富集的前 20 条通路; C: TGF-β1 处理 24 h 与同一时间对照组相比上调基因富集的前 20 条通路。TGF: 转化生长因子; TNF: 肿瘤坏死因子; PI3K: 磷酸肌醇 3-激酶; KEGG: 京都基因和基因组百科全书。

图 6 差异表达基因的 KEGG 分析结果  
Figure 6 Results of the KEGG analysis of differentially expressed genes



数值表示为 log<sub>2</sub>FC 值。FC: 倍数变化。  
图 7 热图显示 13 个转录因子的表达  
Figure 7 The heat map shows the expression changes of 13 transcription factors

其他 7 个基因的表达产物与对照组比较差异无统计学意义。以上结果提示, *Irf8* 和 *Myc* 可能是肾纤维化的潜在干预靶点。

3 讨论

肾纤维化是糖尿病、高血压、免疫复合物沉积等引发的慢性肾脏病的共同病理特征, 表现为 ECM 合成与降解的失调<sup>[1-2]</sup>。TGF-β1 等细胞因子诱导间质成纤维细胞增殖并分化为肌成纤维细胞, 导致 ECM 过度合成, 是肾纤维化发生的直接原因<sup>[3]</sup>。深入了解 TGF-β1 诱导纤维化的机制和 TGF-β1 信号通路下游的效应分子将有助于探索预防和抑制肾纤维化的方法。相比蛋白质组, 转录组的变化更为提前, 因此可以为诊断提供更早期的信息。本研究采用转录组测序技术检测了 TGF-β1 处理 6、12 和 24 h 后 NRK-49F 细胞和对照细胞的基因表达谱, 对差异表达的基因进行了全面分析, 为进一步了解 TGF-β1 诱导肾纤维化的机制提供了信息。

本文资料显示, TGF-β1 处理 6、12 和 24 h 后, 分别有 552、1209 和 1028 个差异表达基因。GO 分析表明, 这些差异表达基因在发育、细胞死亡和细胞迁移过程中显著富集, 而 Zhou 等<sup>[10]</sup>的蛋白质组研究显示差异表达蛋白主要富集在翻译、氧化还原过程、对药物的反应等生物过程, 进一步证明了 TGF-β1 处理的成纤维细胞在转录和翻译水平的差异。KEGG 分析显示, 在 TGF-β1 诱导的早期主要表现为 Hippo、TGF-β、Wnt 信号通路的变化, 与之前的研究报道 TGF-β 信号通路与

Hippo、Wnt 信号通路相互交叉共同影响纤维化一致<sup>[17-18]</sup>;而在 TGF- $\beta$ 1 诱导的晚期主要表现为 ECM 受体相互作用、局灶黏附和黏附分子连接等相关通路的改变,这可能是因为胶原等细胞外基质蛋白开始合成。

为了探索影响以上生物过程和信号通路的转录因子,本研究在 TGF- $\beta$ 1 处理 6 h 时 291 个上调的差异表达基因中筛选到 13 个编码转录因子的基因 (*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Ahr*、*Foxo1*、*Myc*、*Tcf7*、*Foxc2*、*Glis1*),GO 分析显示 *Snai1*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Ahr*、*Foxo1*、*Myc*、*Tcf7* 和 *Foxc2* 参与发育过程, *Snai1*、*Junb*、*Vdr*、*Lef1*、*Ahr*、*Foxo1*、*Myc*、*Tcf7* 和 *Foxc2* 与细胞凋亡相关, *Snai1*、*Lef1*、*Myc* 和 *Foxc2* 参与细胞迁移;KEGG 分析显示 *Lef1*、*Myc* 和 *Tcf7* 参与 Hippo 和

Wnt 信号通路, *Myc* 参与 TGF- $\beta$  信号通路, *Snai1*、*Lef1* 和 *Tcf7* 参与黏附分子连接。在细胞模型中验证发现, TGF- $\beta$ 1 可以诱导其中 9 个编码转录因子基因 (*Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Vdr*、*Lef1*、*Myc*、*Tcf7*) 的表达, 其余 4 个基因 (*Ahr*、*Foxo1*、*Foxc2*、*Glis1*) 的表达水平在 TGF- $\beta$ 1 处理后无显著变化。在动物模型中进一步验证发现, *Snai1*、*Irf8*、*Bhlhe40*、*Junb*、*Arid5a*、*Myc* 和 *Tcf7* 显著上调, *Vdr* 显著下调, *Lef1* 无显著变化。在 GSE104954 数据集中验证发现, *IRF8* 在糖尿病肾病患者和 IgA 肾病患者的肾小管间质中显著高表达, *MYC* 在糖尿病肾病中高表达, 而其他 7 个基因的表达产物与对照组相比无显著差异。

文献检索显示, *Snai1*<sup>[19-20]</sup>、*Junb*<sup>[21]</sup> 和 *Lef1*<sup>[22-23]</sup> 在肾纤维化动物模型中显著上调, 且能够诱导肾

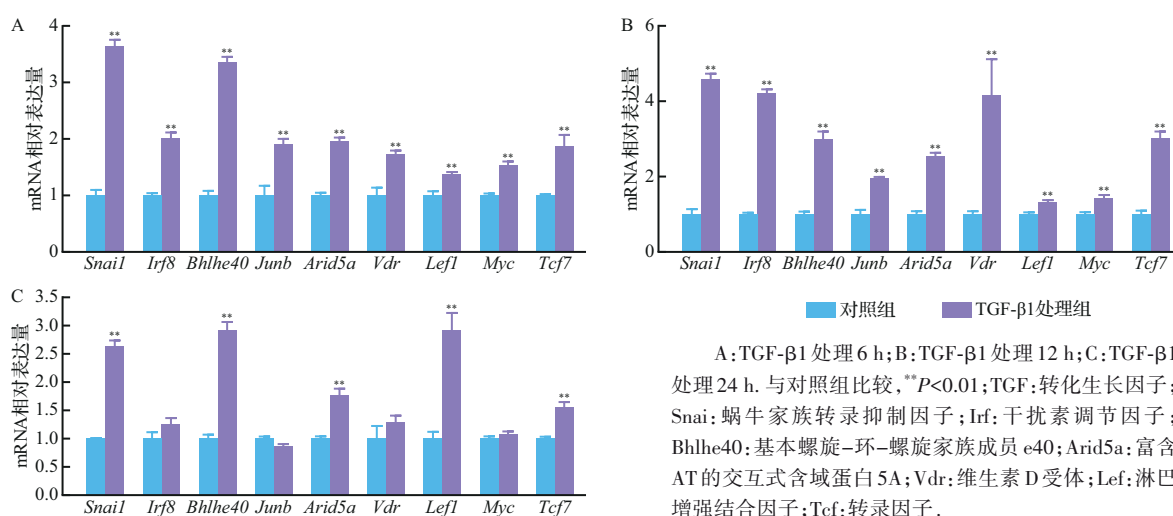


图8 九种转录因子基因在细胞模型中的表达水平

Figure 8 Expression levels of 9 genes in cell models

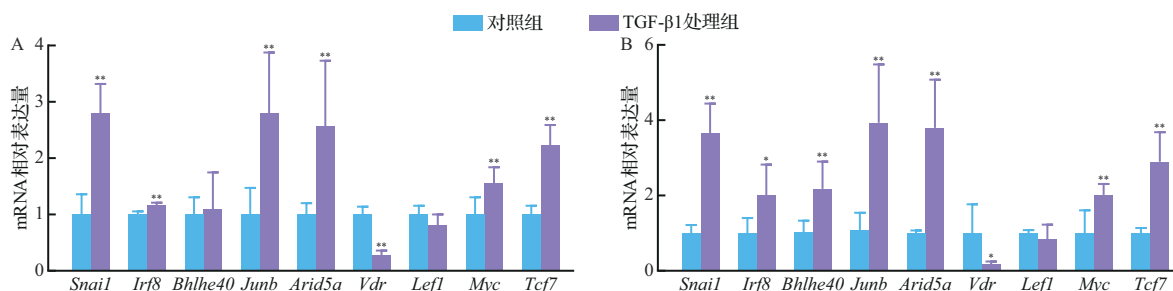


图9 九种转录因子基因在肾纤维化动物模型中的表达水平

Figure 9 Verifying the expression levels of 9 genes in animal models of renal fibrosis

小管上皮细胞-间质细胞转化并促进肾纤维化。但在肾间质成纤维细胞中,TGF- $\beta$ 1 是否能诱导 Snail、Junb 和 Lef1 的表达及其功能尚不清楚。Zhang 等<sup>[24]</sup>通过生物信息学预测发现 Bhlhe40 可能在 SARS-CoV-2 诱导的急性肾损伤到慢性肾脏病的转变中发挥重要作用。Martínez-Arias 等<sup>[25]</sup>发现 Vdr 的水平与肾纤维化程度成负相关。Irf8 是干扰素调节因子家族的转录因子,其特异性结合 I 型 Ifn 和 Ifn 诱导的 MHC I 类基因的上游调节区<sup>[26-27]</sup>。GO 分析显示,Irf8 参与多细胞生物过程的正向调节、对含氧复合物和细胞因子刺激的反应。KEGG 信号通路分析显示,Irf8 与百日咳相关。关于 Irf8 的研究多集中在免疫细胞,既可以作为免疫细胞的转录激活因子,也可以作为抑制因子<sup>[28-29]</sup>。Irf8 是多发性硬化的易感基因,Otake 等<sup>[30]</sup>发现多发性硬化症患者单核细胞和巨噬细胞中 Irf8 下调可能加重纤维化表型。而 Yoshida 等<sup>[31]</sup>的研究显示,Irf8 在抗原提呈细胞(如巨噬细胞、树突状细胞和小胶质细胞)中表达,Irf8 敲除能够抑制小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(一种用于研究多发性硬化症的动物模型);Irf8 一方面通过增强抗原提呈细胞中  $\alpha$ v $\beta$ 8 整合素的表达,激活 TGF- $\beta$  信号,导致 Th17 细胞分化,另一方面通过刺激 IL-12 和 IL-23 的产生、抑制 IL-27 的产生,有利于 Th1 细胞和 Th17 细胞生长和维持的细胞因子环境,从而促进疾病的发生和发展。Fu 等<sup>[32]</sup>发现 Irf8 在肾移植后发生间质纤维化和小管萎缩的肾组织中表达增加。Guo 等<sup>[33]</sup>在数据集 GSE30122 和 GSE30529 中分析了糖尿病肾病患者的差异表达基因,结果显示 Irf8 在糖尿病肾病组显著上调。总之,Irf8 可能是肾纤维化的潜在治疗靶点,但其具体作用机制还须进一步研究。人 MYC 是一种原癌基因,其编码蛋白与 MYC 相关因子 X 形成异源二聚体,该异源二聚体与 DNA 的启动子结合,并调节特定靶基因的转录,许多人类肿瘤中会出现该基因的异常扩增<sup>[34]</sup>。因其在细胞周期进程、细胞凋亡和细胞转化中的作用,近年来越来越多的研究发现该蛋白参与纤维化进程。据报道,Myc 在肾纤维化过程中显著上调,并通过直接结合成纤维细胞的整合素  $\alpha$ v 的启动子促进其表达,进而激活 TGF- $\beta$ 1 信号通路,促进纤维化的发生<sup>[35]</sup>。本文资料进一步证实 TGF- $\beta$ 1 也能反向诱导成纤维细胞中 Myc 的表达,TGF- $\beta$

1、Myc 和整合素  $\alpha$ v 在肾脏成纤维细胞中可能以正反馈的环路发挥促纤维化的作用。

综上所述,本研究对 TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞肾纤维化模型的转录组测序结合细胞、动物、患者数据库层面的验证,提出 Irf8 和 Myc 可能是肾纤维化的潜在干预靶点。今后将进一步探索 Irf8 和 Myc 在肾纤维化进程中的具体作用和机制,以期对肾纤维化的临床诊治提供理论依据。

**致谢** 研究得到国家自然科学基金(32100911)、江苏省高等学校自然科学研究项目(20KJB310002)、2019 年江苏省双创博士项目、2020 年扬州市“绿扬金凤计划”支持

**Acknowledgements** This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100911), Natural Science Research Project for Universities of Jiangsu Province (20KJB310002), 2019 Double-Innovation Doctor Program of Jiangsu Province, 2020 Lyuyang Jinfeng Project of Yangzhou City.

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests** The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2023. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 参考文献(References)

- [1] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309-326.
- [2] FENG X, ZHANG J, YANG R, et al. The CaMKII inhibitory peptide AIP alleviates renal fibrosis through the TGF- $\beta$ /Smad and RAF/ERK pathways[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2023, 386(3): 310-322.
- [3] YUAN Q, TAN R J, LIU Y. Myofibroblast in kidney fibrosis: origin, activation, and regulation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 253-283.
- [4] KUPPE C, IBRAHIM M M, KRANZ J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis[J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 281-286.
- [5] MA T T, MENG X M. TGF- $\beta$ /Smad and renal fibrosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 347-364.
- [6] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [7] NASTASE M V, ZENG-BROUWERS J, WYGRECKA M, et al. Targeting renal fibrosis: mechanisms and drug delivery systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129: 295-307.
- [8] ISAKA Y. Targeting TGF- $\beta$  signaling in kidney fibrosis

- [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2532.
- [9] LI X, DING Z, WU Z, et al. Targeting the TGF- $\beta$  signaling pathway for fibrosis therapy: a patent review (2015—2020)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2021, 31(8): 723-743.
- [10] ZHOU S, YIN X, MAYR M, et al. Proteomic landscape of TGF- $\beta$ 1-induced fibrogenesis in renal fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19054.
- [11] ASLAM B, BASIT M, NISAR M A, et al. Proteomics: technologies and their applications[J]. *J Chromatogr Sci*, 2017, 55(2): 182-196.
- [12] MCCOMBIE W R, MCPHERSON J D, MARDIS E R. Next-generation sequencing technologies[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9(11): a036798.
- [13] SU W L, LIU N, MEI L, et al. Global transcriptomic profile analysis of genes involved in lignin biosynthesis and accumulation induced by boron deficiency in poplar roots[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 156.
- [14] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [15] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *Omics*, 2012, 16(5): 284-287.
- [16] ALTERMANN E, KLAENHAMMER T R. Pathway-Voyager: pathway mapping using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 60.
- [17] PATEL S, TANG J, OVERSTREET J M, et al. Rac-GTPase promotes fibrotic TGF- $\beta$ 1 signaling and chronic kidney disease via EGFR, p53, and Hippo/YAP/TAZ pathways[J]. *FASEB J*, 2019, 33(9): 9797-9810.
- [18] PIERSMA B, BANK R A, BOERSEMA M. Signaling in fibrosis: TGF- $\beta$ , Wnt, and YAP/TAZ converge[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 59.
- [19] GRANDE M T, SÁNCHEZ-LAORDEN B, LÓPEZ-BLAU C, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease[J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 989-997.
- [20] LI S, YU L, HE A, et al. Klotho inhibits unilateral ureteral obstruction-induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- $\beta$ 1/Smad2/Snail1 signaling in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 348.
- [21] YAO F, WANG X, CUI Z K, et al. ETS2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis by targeting JUNB transcription[J]. *Lab Invest*, 2020, 100(3): 438-453.
- [22] XIAO Z, CHEN C, MENG T, et al. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  pathway on matrix metalloproteinase 7[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(2): 140-146.
- [23] JIANG M Q, WANG L, CAO A L, et al. HuangQi decoction improves renal tubulointerstitial fibrosis in mice by inhibiting the up-regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2): 655-669.
- [24] ZHANG W, LIU L, XIAO X, et al. Identification of common molecular signatures of SARS-CoV-2 infection and its influence on acute kidney injury and chronic kidney disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 961642.
- [25] MARTÍNEZ-ARIAS L, PANIZO S, ALONSO-MONTES C, et al. Effects of calcitriol and paricalcitol on renal fibrosis in CKD[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 36(5): 793-803.
- [26] TAMURA T, OZATO K. ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(1): 145-152.
- [27] LEVI B Z, HASHMUELI S, GLEIT-KIELMANOWICZ M, et al. ICSBP/IRF-8 transactivation: a tale of protein-protein interaction[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(1): 153-160.
- [28] SALEM S, LANGLAIS D, LEFEBVRE F, et al. Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8 (K108E) mutation[J]. *Blood*, 2014, 124(12): 1894-1904.
- [29] SALEM S, SALEM D, GROS P. Role of IRF8 in immune cells functions, protection against infections, and susceptibility to inflammatory diseases[J]. *Hum Genet*, 2020, 139(6-7): 707-721.
- [30] OTOTAKE Y, YAMAGUCHI Y, ASAMI M, et al. Downregulated IRF8 in monocytes and macrophages of patients with systemic sclerosis may aggravate the fibrotic phenotype[J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(8): 1954-1963.
- [31] YOSHIDA Y, YOSHIMI R, YOSHII H, et al. The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF- $\beta$  signaling and promotes neuroinflammation[J]. *Immunity*, 2014, 40(2): 187-198.
- [32] FU Q, LIAO M, FENG C, et al. Profiling of mRNA of interstitial fibrosis and tubular atrophy with subclinical inflammation in recipients after kidney transplantation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(14): 5215-5231.
- [33] GUO M, DAI Y, JIANG L, et al. Bioinformatics analysis of the mechanisms of diabetic nephropathy via novel biomarkers and competing endogenous RNA network[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 934022.
- [34] GAO F Y, LI X T, XU K, et al. c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 28.
- [35] SHEN Y, MIAO N, WANG B, et al. c-Myc promotes renal fibrosis by inducing integrin  $\alpha$ -mediated transforming growth factor- $\beta$  signaling[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(4): 888-899.

[本文编辑 余方沈敏]