

# TLR9 通路激活对原代肾小管上皮细胞转录组的影响

李一鸣 徐冬雪 张婧 锁进猛 姜军 钱瑶瑶 彭志勇

武汉大学中南医院重症医学科,重症医学国家临床重点专科,湖北省重症医学临床医学研究中心,武汉 430071

通信作者:彭志勇,Email:pengzy5@hotmail.com

**【摘要】目的** 探讨 Toll 样受体 9(TLR9)信号通路激活对肾小管细胞转录组的影响。**方法** 提取并培养小鼠原代肾小管上皮细胞,在细胞融合度达 80% 时分为两组,分别加入 10  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(PBS, PBS 对照组)和终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 TLR9 激活剂胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸(CpG-ODN, CpG-ODN 处理组)。提取细胞 RNA 后在 Illumina 平台进行测序,使用差异基因分析软件 DEGseq 分析两组细胞中基因的差异表达情况,通过 Goatools 和 KOBAS 在线软件分析差异基因所参与的信号通路,应用 Homer 软件预测转录因子。**结果** 与 PBS 对照组相比, CpG-ODN 处理后有 584 个显著的差异表达基因,其中 102 个基因表达上调,482 个表达下调。差异表达基因富集最显著的基因本体(GO)为  $\beta$ -干扰素响应、病毒响应或防御等炎症反应相关条目;京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)信号通路富集结果显示,富集系数最显著的信号通路包括 2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性、核糖核酸酶活性的调节、病毒生命周期的负调控、 $\beta$ -干扰素响应和对原生动物的防御反应等。转录因子预测结果显示,干扰素调节因子 3(IRF3)是差异基因启动子序列上富集最显著的转录因子;IRF3 是 TLR9 下游表达差异最显著的转录因子,转录因子 21(TCF21)、锌指蛋白 135(ZNF135)和阳性调节域 4(PRD4)等转录因子可能是 TLR9 信号通路的新候选靶标。**结论** CpG-ODN 激活 TLR9 信号通路,原代肾小管上皮细胞能直接响应 CpG-ODN 的刺激并发生转录组学变化,为进一步探究 TLR9 信号通路在脓毒症相关性急性肾损伤中的分子机制研究提供了基础。

**【关键词】** 原代肾小管上皮细胞; 胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸; 脓毒症相关性急性肾损伤; Toll 样受体 9 通路

基金项目:国家自然科学基金(81971816, 81772046, 82102273)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220228-00183

## Transcriptome changes upon Toll-like receptor 9 pathway activation in primary renal tubular epithelial cells

Li Yiming, Xu Dongxue, Zhang Jing, Suo Jinmeng, Jiang Jun, Qian Yaoyao, Peng Zhiyong

Department of Critical Care Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, State Key Clinical Specialty of Critical Care Medicine, Hubei Clinical Research Center of Critical Care Medicine, Wuhan 430071, Hubei, China

Corresponding author: Peng Zhiyong, Email: pengzy5@hotmail.com

**【Abstract】Objective** To explore the effect of Toll-like receptor 9 (TLR9) signaling pathway activation on the transcriptome in the renal tubular cells. **Methods** Mouse primary renal tubular epithelial cells were extracted and cultured. When the degree of cell fusion reached 80%, they were divided into two groups, which were added with 10  $\mu$ L phosphate buffered saline (PBS, PBS control group) and TLR9 activator cytosine phosphate guanidine oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) with a final concentration of 5  $\mu$ mol/L (CpG-ODN treatment group). The RNA sequencing was performed on the Illumina platform after extraction. DEGseq software was used to analyze the differential expression of genes between the two groups. Goatools and KOBAS online software were used to analyze the differential genes involved signal pathways. Homer software was used to predict transcription factors. **Results** Compared with the PBS control group, there were a total of 584 differentially expressed genes in the CpG-ODN treatment group, of which 102 were up-regulated and 482 were down-regulated. The most significantly enriched gene ontology (GO) terms of differentially expressed genes included response to interferon- $\beta$ , defense response to virus and other inflammatory pathway. The most significantly enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways included 2'-5'-oligoadenylate synthase activity, regulation of ribonuclease activity, negative regulation of virus life cycle, cellular response to interferon- $\beta$  and defense response to protozoan. The results of transcription factor prediction showed that interferon regulatory factor 3 (IRF3) was the most significantly enriched transcription factor in the promoter sequence of differential genes; the most significant transcription factor downstream of TLR9 was IRF3, and other predicted transcription factors such as transcription factor 21 (TCF21), zinc finger protein 135 (ZNF135), and PR domain containing 4 (PRDM4) might be new candidates for TLR9 signaling pathway. **Conclusion** CpG-ODN activates TLR9 signaling pathway, and primary renal tubular epithelial cells can directly respond to CpG-ODN stimulation and undergo transcriptome changes, which provides a basis for further research on the molecular mechanism of TLR9 pathway in

sepsis induced acute kidney injury.

**【Key words】** Primary renal tubular epithelial cell; Cytosine phosphate guanidine oligodeoxynucleotide; Sepsis-associated acute kidney injury; Toll-like receptor 9 pathway

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81971816, 81772046, 82102273)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220228-00183

脓毒症是由多种病原体、创伤、烧伤及外科手术等因素造成的感染引起机体对感染反应失调,导致严重的、复杂的、失控的免疫反应并危及生命的多器官功能障碍综合征。肾脏是脓毒症最容易累及的器官,约有50%的脓毒症患者发生急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)<sup>[1]</sup>。临床中,脓毒症相关性AKI的治疗一直面临着巨大的挑战。近年来,虽然脓毒症相关性AKI的诊断和治疗取得了一定的进展,但是脓毒症相关性AKI的发病率和致死率仍不容乐观<sup>[2]</sup>,且AKI发病过程中具体的生物学机制仍存在着大量谜题。因此,从细胞生物学和分子水平深入研究脓毒症相关性AKI的发病机制,对其临床中的预防与治疗具有极大的价值<sup>[3]</sup>。在脓毒症中,病原微生物进入机体,病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)均被细胞的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别引起免疫应答,进而造成肾细胞焦亡、凋亡、坏死、坏死性凋亡等,进一步引起肾损伤<sup>[4]</sup>,在此过程中, Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)识别各类型的病原分子并激活相应的信号通路、细胞发生应答反应,产生多种炎症因子,进而介导肾损伤的发生发展<sup>[5]</sup>。

在脓毒症相关性AKI复杂的发病机制中,炎症反应、氧化应激、缺血/再灌注等多种因素导致的肾小管上皮细胞损伤是主要的病理机制<sup>[6-7]</sup>。在脓毒症相关性AKI中,不同的TLR可识别不同类型的病原分子,其中TLR9在脓毒症相关性AKI中的信号转导作用被认为是重要的发病机制之一<sup>[8]</sup>。TLR9是一种定位于细胞内质网膜上的PRR,它主要识别胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸(cytosine phosphate guanidine oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)并激活下游的炎症反应<sup>[9]</sup>。虽然已经有研究表明在小鼠模型中敲除或干扰TLR9能够抑制脓毒症相关性AKI,但其中的分子机制仍不完全清楚。TLR9主要在树突状细胞(dendritic cell, DC)和B细胞中表达,在巨噬细胞中也有一定程度的表达<sup>[10]</sup>。肾小管上皮细胞对TLR9信号通路激活的直接响应如何仍缺乏完整

的研究。脓毒症中各类型细胞在TLR9通路激活后的转录水平变化可为进一步探究脓毒症相关性AKI中TLR9激活的作用和机制提供线索。本研究对TLR9激活剂CpG-ODN处理的原代肾小管上皮细胞的转录组进行高通量测序,筛选出差异常表达基因并分析其功能,以期为进一步阐明TLR9通路在脓毒症相关性AKI中的分子机制提供线索。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要材料:** 12周龄雄性C57BL/6小鼠购自北京维通利华公司,动物合格证号:SCXK(京)2019-0010。DMEM培养基购自美国Hyclone公司,细胞培养基血清购自以色列Biological Industries公司,CpG-ODN购自美国InvivoGen公司,Ⅱ型胶原酶购自上海翌圣生物科技公司。

**1.2 小鼠原代肾小管上皮细胞提取和培养:** 异氟烷吸入麻醉小鼠后取双侧肾脏,剔除髓质。冰上剪碎皮质后用Ⅱ型胶原酶在37℃恒温箱消化肾组织,中止消化后用70 μm细胞筛过筛,加入含2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤原代肾小管上皮细胞,用含有10%原代细胞血清的完全培养基重悬后接种于培养皿中,在37℃细胞培养箱中培养小鼠原代肾小管细胞。本研究动物实验方案经武汉大学实验动物管理与使用委员会审批(审批号:WP2020-08022),符合动物福利与伦理的相关要求。

**1.3 CpG-ODN处理肾小管上皮细胞:** 将原代肾小管细胞培养6~7 d,在融合度达80%时加入10 μL的CpG-ODN(终浓度为5 μmol/L),PBS对照组加入等体积的PBS,处理18 h后收集细胞提取RNA。

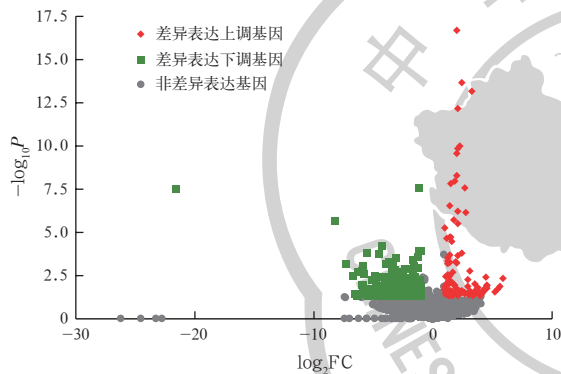
**1.4 RNA提取:** 应用胰酶消化原代肾小管上皮细胞,按TRIzol试剂盒说明书提取RNA,并进行RNA的浓度和质量测定,取总质量>1 μg的合格RNA用于后续建库。

**1.5 文库的构建与测序:** 使用TruSeq™ RNA建库试剂盒,在Illumina平台构建RNA-Seq文库,文库构建RNA的起始量为1 μg。经过接头连接等步骤完成文库构建后,使用NovaSeq 6000型测序仪进行测序,测序模式为双端150 bp。

**1.6 数据分析及处理:**数据质控用 SeqPrep、Sickle 软件处理。使用 HISAT2 软件进行匹配。用 DEGseq 软件进行差异表达基因分析,参数设置:Q 值 $\leq 0.05$ ,  $|\log_2$  差异倍数(fold change, FC)| $> 1$ 。基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路分析用 Goatools、KOBAS 在线软件完成。转录因子预测用 Homer 软件完成。

**2 结果**

**2.1 差异表达基因分析:**差异表达基因火山图显示(图 1),差异表达基因共 584 个,其中 482 个表达下调,102 个表达上调。与 PBS 对照组相比,CpG-ODN 处理组差异表达最显著的基因共 25 个,其中表达上调 21 个、表达下调 4 个(表 1)。

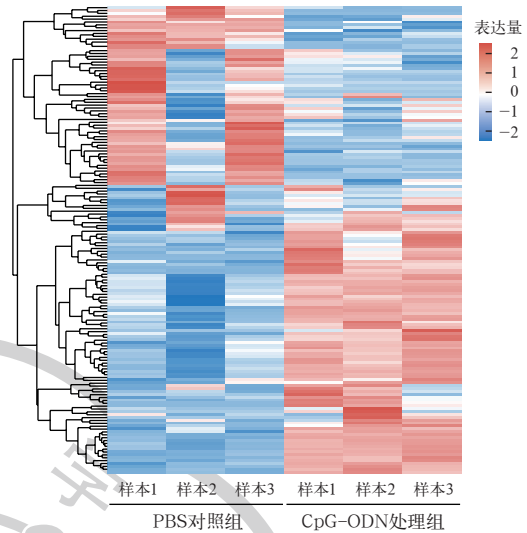


注:PBS 为磷酸盐缓冲液,CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸,FC 为差异倍数

**图 1 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因火山图**

依据基因表达量对 6 个样本进行热图分析,结果显示(图 2),从整体水平来看,CpG-ODN 处理后的样本能很好地聚类在一起,表达谱的变化趋势也基本一致,与 PBS 对照组相比呈现明显的区别。PBS

对照组中样本 2 与其他两个样本之间的基因表达背景存在一定差异,可能与个体差异有关。



注:PBS 为磷酸盐缓冲液,CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸

**图 2 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因热图**

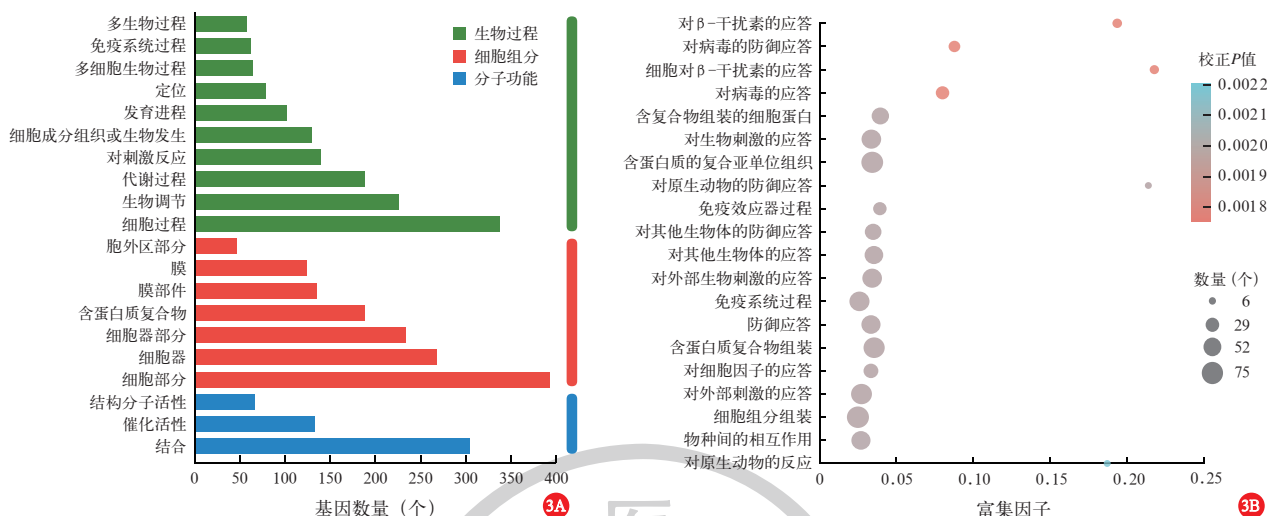
**2.2 差异表达基因的 GO 分析:**对差异表达基因进行 GO 分析,结果显示(图 3A),在生物过程方面,主要涉及生物调节、响应刺激、代谢和免疫等;关于细胞组分,主要包括膜结构、细胞器和蛋白复合物等;在分子功能方面,主要涉及结合、催化活性和分子功能调节三方面。富集系数前 20 位 GO 信息主要包括  $\beta$ -干扰素响应、病毒响应或防御等炎症反应相关条目(图 3B)。

**2.3 差异表达基因的 KEGG 分析:**KEGG 直方图显示(图 4A),所有差异基因可能涉及的信号通路包括代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物系统和疾病相关 6 个方面,其中涉及免疫系统和

**表 1 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因情况**

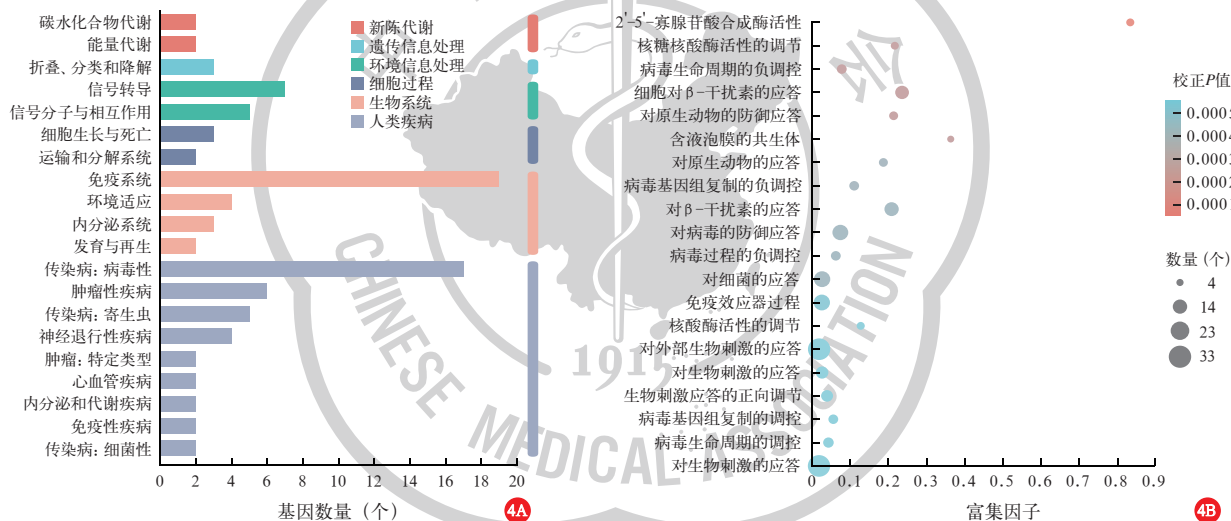
基因名称	中文名称	log <sub>2</sub> FC	P 值	变化趋势	基因名称	中文名称	log <sub>2</sub> FC	P 值	变化趋势
TAGLN	转凝蛋白	-1.24	2.55 × 10 <sup>-8</sup>	下调	TRIM30a	三重基序 30a	1.83	1.00 × 10 <sup>-8</sup>	上调
PGK1-RS7	磷酸甘油酸激酶 1 相关序列 7	-4.34	6.18 × 10 <sup>-5</sup>	下调	OAS3	寡腺苷酸合成酶 3	2.12	5.69 × 10 <sup>-7</sup>	上调
Gm37385	预测基因 37385	-8.24	2.09 × 10 <sup>-6</sup>	下调	OAS2	寡腺苷酸合成酶 2	2.78	6.95 × 10 <sup>-7</sup>	上调
Gm45733	预测基因 45733	-21.63	3.16 × 10 <sup>-8</sup>	下调	RTP4	受体转运蛋白 4	1.98	4.85 × 10 <sup>-9</sup>	上调
CMPK2	单磷酸胞苷激酶 2	1.45	1.83 × 10 <sup>-5</sup>	上调	IFIT1	干扰素诱导四肽重复蛋白 1	2.24	9.64 × 10 <sup>-11</sup>	上调
RSAD2	腺苷氨酸结构域 2	2.69	2.57 × 10 <sup>-8</sup>	上调	ISG15	干扰素刺激蛋白 15	2.11	6.20 × 10 <sup>-13</sup>	上调
Mx2	Mx 动力蛋白 GTP 酶 2	3.28	6.35 × 10 <sup>-14</sup>	上调	XAF1	XIAP 相关因子 1	2.09	1.34 × 10 <sup>-10</sup>	上调
IRF7	干扰素调节因子 7	1.99	1.74 × 10 <sup>-17</sup>	上调	IFIT2	干扰素诱导四肽蛋白 2	1.14	2.15 × 10 <sup>-5</sup>	上调
IFI44	干扰素诱导蛋白 44	2.44	1.95 × 10 <sup>-14</sup>	上调	IFGPI	干扰素诱导 GTP 酶 1	1.72	1.95 × 10 <sup>-6</sup>	上调
GBP3	鸟苷结合蛋白 3	1.54	1.82 × 10 <sup>-5</sup>	上调	TRIM30d	三重基序 30d	2.06	2.96 × 10 <sup>-6</sup>	上调
GBP2	鸟苷结合蛋白 2	1.40	2.94 × 10 <sup>-7</sup>	上调	IGTP	干扰素诱导 GTP 酶结合蛋白	1.03	5.55 × 10 <sup>-6</sup>	上调
OAS1b	寡腺苷酸合成酶 1b	1.57	3.27 × 10 <sup>-5</sup>	上调	TGTP1	T 细胞特异性 GTP 酶 1	1.54	1.48 × 10 <sup>-8</sup>	上调
USP18	泛素特异性蛋白酶 18	2.01	2.65 × 10 <sup>-10</sup>	上调					

注:PBS 为磷酸盐缓冲液,CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸,FC 为差异倍数



注: PBS 为磷酸盐缓冲液, CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸, GO 为基因本体

图3 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因的 GO 注释(A)及富集分析(B)

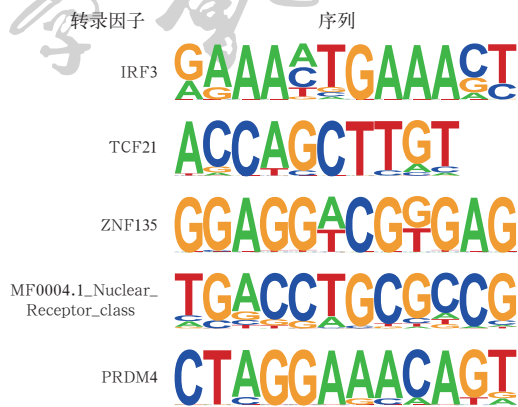


注: PBS 为磷酸盐缓冲液, CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸, KEGG 为京都基因与基因组百科全书数据库

图4 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因 KEGG 分析的直方图(A)及富集分析(B)

病毒感染疾病的基因最多。富集系数最显著的信号通路包括 2'-5'-寡核苷酸合成酶活性、核糖核酸酶活性的调节、病毒生命周期的负调控、β-干扰素响应和对原生动物的防御反应等(图 4B)。

2.4 差异表达基因启动子序列转录因子预测(图 5): 为了进一步研究肾小管上皮细胞中 TLR9 信号通路的下游转录调节过程,本研究对差异基因启动子序列上的转录因子结合基序进行了预测分析,结果显示,显著性排名前 5 位的转录因子为干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3),转录因子 21(transcription factor 21, TCF21)、锌指蛋白 135(zinc finger protein 135, ZNF135)、细胞核受体 MF0004.1\_Nuclear\_Receptor\_class 和阳性调节域 4(PR domain containing 4, PRDM4)。



注: PBS 为磷酸盐缓冲液, CpG-ODN 为胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸, IRF3 为干扰素调节因子 3, TCF21 为转录因子 21, ZNF135 为锌指蛋白 135, MF0004.1\_Nuclear\_Receptor\_class 为细胞核受体, PRDM4 为阳性调节域 4

图5 PBS 对照组与 CpG-ODN 处理组小鼠肾小管上皮细胞差异表达基因启动子序列的转录因子预测

### 3 讨论

脓毒症发生发展过程中,细菌入侵机体,产生大量的内毒素,处于炎症细胞浸润环境中的肾小管发生细胞自噬、细胞凋亡及坏死等<sup>[11]</sup>,损伤细胞破裂释放DNA,非甲基化的DNA可以被肾小管上皮细胞表面TLR9识别并激活TLR9信号通路<sup>[12]</sup>,进一步激活炎症反应,从而释放多种炎症因子和趋化因子<sup>[13]</sup>。本研究中应用高通量转录组测序技术对肾小管上皮细胞在CpG-ODN处理后的基因表达变化进行了全面分析,从分子水平揭示了TLR9信号通路激活对肾小管上皮细胞转录组的直接影响,有助于筛选脓毒症相关性AKI的分子标志物和寻找新的治疗靶点。

TLR9在多种病原体引起的脓毒症相关性AKI的发生中发挥了促进作用<sup>[14]</sup>,但其中还有大量分子机制仍不清楚。以TLR9为靶标的治疗也仅停留在实验研究阶段,与临床应用仍存在很大的距离<sup>[15]</sup>。有研究者应用野生型和TLR9敲除型小鼠构建了盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and perforation, CLP)脓毒症模型,结果显示,野生型及TLR9敲除型小鼠的早期血浆和腹腔内线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)水平均升高,且TLR9敲除型小鼠腹腔内循环mtDNA升高程度明显大于野生型小鼠,白细胞向腹腔的迁移增多,血浆细胞因子的产生和脾脏凋亡减少,说明mtDNA可激活TLR9并参与细胞因子的产生、脾脏凋亡和肾脏损伤<sup>[12]</sup>。虽然一系列的研究已经指出敲除或干扰TLR9能显著减轻不同模型中脓毒症相关性AKI的症状<sup>[16-17]</sup>,但尚无针对肾脏细胞TLR9特异性敲除的研究。TLR9在不同细胞中表达与否或表达量的高低存在差异,不同细胞下游通路的激活状态也存在差异<sup>[18]</sup>。因此,具体探究疾病过程中各种细胞在TLR9信号通路激活后的应答,对促进脓毒症相关性AKI的治疗具有重要意义。本研究中针对肾小管上皮细胞这一脓毒症相关性AKI中主要的细胞损伤类型进行了检测,并选用了原代细胞作为实验模型,结果表明,肾小管上皮细胞能直接识别CpG-ODN信号,并在转录组水平产生相应的应答,且差异表达基因的功能主要与免疫系统和抗病毒反应相关。

在肾小管细胞中,循环DNA激活TLR9通路可通过下游的髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、内向整流钾离子通道基因(inwardly

rectifying K<sup>+</sup> channel, IRK1、IRK4)、肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)等因子激活核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),导致炎症反应,从而介导肾小管细胞进一步损伤<sup>[13]</sup>。本研究中得到的CpG-ODN诱导的差异表达基因功能分析结果也表明,肾小管上皮细胞发生了炎症反应应答。在本研究表达上调的差异基因中,干扰素诱导四肽重复蛋白(interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeat, IFIT1、IFIT2)、干扰素诱导GTP酶结合蛋白(interferon induced GTPase, IGTP)、干扰素诱导蛋白44(interferon-induced protein 44, IFI44)、干扰素刺激蛋白15(interferon-stimulated gene 15, ISG15)、泛素特异性蛋白酶18(ubiquitin specific peptidase 18, USP18)等都是炎症反应相关信号通路的下游应答分子<sup>[19]</sup>。IFIT蛋白质通过调节细胞和病毒蛋白质及RNA的功能抑制病毒复制。IFI是由34个氨基酸残基以反向平行的方式构成的多肽,但它们独特的三级结构使其能够结合不同的分子,以不同的方式影响宿主-病毒的相互作用。本研究中通过测序揭示了肾小管上皮细胞响应CpG-ODN的IFIT蛋白质,为脓毒症中肾小管损伤提供了候选分子标志物和潜在治疗靶标。在本研究表达下调的差异基因中,磷酸甘油酸激酶1相关序列7(phosphoglycerate kinase 1 related sequence 7, PGK1-RS7)是用于预测磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)变化的关键基因;转凝蛋白(transgelin, TAGLN)可以编码一种形状变化和转化敏感的肌动蛋白结合蛋白,属于钙调蛋白家族,敲除后可造成肌动蛋白丝分布和细胞骨架组织改变,本课题组推测TAGLN的表达下调可能与在CpG-ODN刺激下肾小管细胞的正常功能受到抑制有关。

脓毒症及细菌感染导致的疾病中,机体的炎症反应激活及“细胞因子风暴”是临床治疗的极大挑战。周林等<sup>[20]</sup>研究报道,在脓毒症相关性肺损伤中,肺组织TLR9表达量上升,血清炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素(interleukins, IL-6、IL-1 $\beta$ )水平均上升。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脓毒症所致的肺损伤中,循环DNA释放增加,激活TLR9信号通路,放大细菌感染<sup>[21]</sup>。因此,阻断炎症放大的信号通路可能是治疗脓毒症相关性AKI的一个关键环节。本研

究中转录组测序结果也为选择 TLR9 为靶点治疗脓毒症相关性 AKI 提供了依据,即肾小管上皮细胞在 TLR9 信号通路激活的情况下,可直接导致抗病毒相关因子的表达。

针对不同的感染病原体,机体应答产生的下游细胞因子并不相同。本研究中通过将 TLR9 激动剂加入原代肾小管上皮细胞并进行测序,得到了差异表达基因,为进一步筛选脓毒症相关性 AKI 中肾小管上皮细胞损伤标志物提供了候选靶标。此外,本研究中转录因子预测结果显示,最显著的下游转录因子为 IRF3,这与 TLR9 下游激活 IRF3 的认识相符。环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、活化蛋白 1(activator protein 1, AP1)、NF- $\kappa$ B 等炎症转录因子,在单独 CpG-ODN 刺激下并没有显著激活。IRF7 的 RNA 水平提升,对其下游基因的转录调控没有显著影响,可能与处理时间有关。本研究中预测的 TCF21、ZNF135、PRDM4 等其他转录因子在 TLR9 信号通路或脓毒症相关性 AKI 中的功能尚不明确,这些基因可能是 TLR9 信号通路在脓毒症相关性 AKI 中详细作用机制的新候选靶标。

综上所述,本研究中探讨了肾小管上皮细胞在 CpG-ODN 激活 TLR9 信号通路后转录组的变化,为 TLR9 信号通路在脓毒症相关性 AKI 中的作用机制研究提供了新的候选下游分子,也为针对 TLR9 信号通路治疗脓毒症相关性 AKI 的靶向治疗策略提供了理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

[1] Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10212): 1949–1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32563-2.

[2] 张笑婷, 纪文焘, 薄禄龙, 等. 脓毒症基础研究的进展及未来方向 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (8): 919–921. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210126-00132.

[3] 张志雄, 姜南, 赵忠岩, 等. 脓毒症所致急性肾损伤的发病机制研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23 (10): 1853–1857. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2019.10.061.

[4] 蔺晨雨, 肖滴. 急性肾损伤实验室诊断的研究进展 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2021, 9 (2): 163–168. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2021.02.018.

[5] Uchida T, Ito S, Kumagai H, et al. Roles of natural killer T cells and natural killer cells in kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10): 2487. DOI: 10.3390/ijms20102487.

[6] El-Achkar TM, Dagher PC. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308 (12): F1317–1323. DOI: 10.1152/ajprenal.00030.2015.

[7] Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment [J]. *Kidney Int*, 2019, 96 (5): 1083–1099. DOI: 10.1016/j.kint.2019.05.026.

[8] Han SJ, Li HM, Kim M, et al. Kidney proximal tubular TLR9 exacerbates ischemic acute kidney injury [J]. *J Immunol*, 2018, 201 (3): 1073–1085. DOI: 10.4049/jimmunol.1800211.

[9] Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury [J]. *Nature*, 2010, 464 (7285): 104–107. DOI: 10.1038/nature08780.

[10] Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 387. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00387.

[11] Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14 (7): 417–427. DOI: 10.1038/s41581-018-0005-7.

[12] Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, et al. Role of mitochondrial DNA in septic AKI via Toll-like receptor 9 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27 (7): 2009–2020. DOI: 10.1681/ASN.2015040376.

[13] Liu JY, Jiä ZJ, Gong W. Circulating mitochondrial DNA stimulates innate immune signaling pathways to mediate acute kidney injury [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 680648. DOI: 10.3389/fimmu.2021.680648.

[14] Lam LKM, Murphy S, Kokkinaki D, et al. DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13 (616): eabj1008. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj1008.

[15] Kennedy E, Coulter E, Halliwell E, et al. TLR9 expression in chronic lymphocytic leukemia identifies a promigratory subpopulation and novel therapeutic target [J]. *Blood*, 2021, 137 (22): 3064–3078. DOI: 10.1182/blood.2020005964.

[16] Li HQ, Sun H, Xu YR, et al. Curcumin plays a protective role against septic acute kidney injury by regulating the TLR9 signaling pathway [J]. *Transl Androl Urol*, 2021, 10 (5): 2103–2112. DOI: 10.21037/tau-21-385.

[17] Naito Y, Tsuji T, Nagata S, et al. IL-17A activated by Toll-like receptor 9 contributes to the development of septic acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318 (1): F238–F247. DOI: 10.1152/ajprenal.00313.2019.

[18] Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, et al. Circadian clock proteins and immunity [J]. *Immunity*, 2014, 40 (2): 178–186. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.02.002.

[19] Fensterl V, Sen GC. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis [J]. *J Virol*, 2015, 89 (5): 2462–2468. DOI: 10.1128/JVI.02744-14.

[20] 周林, 周明根, 邹子俊, 等. 脓毒症小鼠肺组织中 TLR9 与相关炎症因子的表达 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32 (23): 3845–3848. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.23.012.

[21] Zeng ZG, Li D, Liu F, et al. Mitochondrial DNA plays an important role in lung injury induced by sepsis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 2018: 28142. DOI: 10.1002/jcb.28142.

(收稿日期: 2022-02-28)

## 关于经过广告审批后的广告中存在不规范医学名词术语未予更改的声明

依照广告审批的相关规定,按照广告厂家的要求,本刊刊登的新活素、血必净及佳维体广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容中“适应症”“禁忌症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”“禁忌证”,“其它”未修改为“其他”,“成份”未修改为“成分”,时间单位仍用汉字表示,剂量单位“ml”未修改为“mL”,标示数值范围的标点符号“-”未修改为“~”。特此声明!