

• 论著 •

分泌性白细胞蛋白酶抑制因子可抑制 LPS 诱导人近端肾小管上皮细胞炎症反应和凋亡

张德龙 汪文杰 邵仁德 汪洋 吴忠展 鲁厚清

铜陵市人民医院重症医学科,安徽铜陵 244000

通信作者:鲁厚清, Email: hou.qingl@163.com

【摘要】 目的 寻找脓毒症相关性急性肾损伤(AKI)的关键基因,为脓毒症相关性 AKI 的治疗提供理论和实验依据。**方法** ① 生物信息学分析:对基因表达数据库(GEO)中 GSE30718 和 GSE53773 数据集进行生物信息学分析,这两个数据集记录了肾移植手术前后对移植肾进行规律性肾活检的基因芯片数据,一部分患者在肾移植后发生了 AKI。对两个数据集中 AKI 相关基因表达差异进行分析,找到在两个数据集中差异一致且受试者工作特征曲线下面积(AUC)较高的基因作为目的基因,进行后续细胞验证实验。② 细胞验证实验:体外培养人近端肾小管上皮细胞株 HK2,使用 10 mg/L 脂多糖(LPS)孵育 6 h 制备 LPS-HK2 细胞模型(LPS 模型组),并设空白对照组;使用小干扰 RNA (siRNA) 技术对 LPS-HK2 细胞中通过生物信息学分析得出的目的基因进行敲减(基因敲减组),并设置基因阴性对照组。采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 HK2 细胞中目的基因的表达;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养液中炎症因子水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞中凋亡关键蛋白的表达。**结果** ① 生物信息学分析结果:两个数据集间有 325 个基因呈现相同的表达趋势,其中 144 个显著下调,181 个显著上调,而分泌性白细胞蛋白酶抑制因子(SLPI)在两个数据集中表达差异的统计学意义均较大;进一步受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析证实,GSE30718 和 GSE53773 数据集中 SLPI 表达量对 AKI 的诊断效能均较大,AUC 分别为 0.83 和 0.92。故选择 SLPI 作为目的基因进行后续细胞验证实验。② 细胞验证实验结果:RT-qPCR 结果显示,LPS 模型组细胞中 SLPI 表达较空白对照组显著升高($2^{-\Delta\Delta CT}$: 1.80 ± 0.14 比 1.00 ± 0.11 , $P < 0.01$),变化趋势与生物信息学分析结果相符。进一步敲减 SLPI 基因分析显示,基因敲减组 LPS-HK2 细胞培养液中炎症因子水平较阴性对照组显著上调[白细胞介素-6(IL-6, ng/L): 509.58 ± 27.08 比 253.87 ± 75.83 , IL-1 β (ng/L): 490.99 ± 49.52 比 239.67 ± 26.97 , 肿瘤坏死因子- α (TNF- α , ng/L): 755.22 ± 48.66 比 502.06 ± 10.92 , 均 $P < 0.01$],说明 SLPI 可抑制 LPS 诱导的 HK2 细胞炎症反应;基因敲减组 LPS-HK2 细胞凋亡关键蛋白 Bax、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)表达均较阴性对照组显著升高[Bax 蛋白(Bax/GAPDH): 1.38 ± 0.12 比 1.00 ± 0.10 , caspase-3 蛋白(caspase-3/GAPDH): 1.44 ± 0.15 比 1.00 ± 0.11 , 均 $P < 0.05$],而 Bcl-2 表达显著降低(Bcl-2/GAPDH: 0.83 ± 0.08 比 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$),说明 SLPI 可抑制细胞在炎症反应中的凋亡。**结论** SLPI 能抑制 LPS 诱导的 HK2 细胞炎症反应和凋亡,可能参与肾小管细胞在脓毒症反应中的保护机制,成为脓毒症相关性 AKI 治疗的潜在靶点。

【关键词】 急性肾损伤; 脓毒症; 分泌性白细胞蛋白酶抑制因子**基金项目:** 安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2021b092);安徽省铜陵市科技计划项目(20200203041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210903-01315

Secretory leukocyte peptidase inhibitor inhibits the inflammatory response and apoptosis of lipopolysaccharide-induced human proximal renal tubular cells

Zhang Delong, Wang Wenjie, Shao Rende, Wang Yang, Wu Zhongzhan, Lu Houqing

Department of Intensive Care Unit, Tongling People's Hospital, Tongling 244000, Anhui, China

Corresponding author: Lu Houqing, Email: hou.qingl@163.com

【Abstract】 Objective To screen out the potential key genes of sepsis-associated acute kidney injury (AKI), and provide theoretical and experimental evidence for the treatment of sepsis-associated AKI. **Methods** ① Bioinformatics analysis: two gene expression datasets (GSE30718 and GSE53773) were downloaded for bioinformatics analysis from the Gene Expression Omnibus (GEO). These two datasets recorded mRNA microarray data from kidney biopsies before and after kidney transplantation, and a subset of patients developed AKI after kidney transplantation. Differential analysis was conducted, and the genes with the same differential expression and a higher area under the receiver operator characteristic curve (AUC) in both databases were used as the target gene for subsequent cell experiments. ② Cell validation experiment: human proximal renal tubular cells HK2 were cultured *in vitro*, and lipopolysaccharide (LPS) was used for establishing LPS-HK2 cell model (LPS 10 mg/L for 6 hours, LPS model group), and the blank control group was set. Then, small interfering RNA (siRNA) technology was used to knock down the target gene obtained by bioinformatics analysis in LPS-HK2 cells (gene knockdown group), and a gene negative control group was set. The real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique was used to detect the expression of the target gene in HK2 cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect

the levels of inflammatory factors in the cell supernatants. Western blotting was used to detect the expressions of key apoptosis proteins. **Results** ① Results of bioinformatics analysis: 325 genes in the two datasets showed the same expression trend, of which 144 were significantly down-regulated and 181 were significantly up-regulated, while the expression difference of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the two datasets was both statistically significant. Further receiver operator characteristic curve (ROC curve) analysis confirmed that the SLPI expression in GSE30718 and GSE53773 datasets had a high diagnostic efficiency for AKI, with AUC of 0.83 and 0.92, respectively. Therefore, SLPI was selected as the target gene for subsequent cell validation experiment. ② Cell validation experiment: the RT-qPCR analysis showed that the expression of SLPI in LPS-HK2 cells of the LPS model group was significantly higher than that of the blank control group ($2^{-\Delta\Delta CT}$: 1.80 ± 0.14 vs. 1.00 ± 0.11 , $P < 0.01$), and the change trend was the same with the results of bioinformatics analysis. Furthermore, knockdown SLPI gene analysis showed that the levels of inflammatory factors in LPS-HK2 cells supernatants in the gene knockdown group were significantly higher than those in the negative control group [Interleukin-6 (IL-6, ng/L): 509.58 ± 27.08 vs. 253.87 ± 75.83 , IL-1 β (ng/L): 490.99 ± 49.52 vs. 239.67 ± 26.97 , tumor necrosis factor- α (TNF- α , ng/L): 755.22 ± 48.66 vs. 502.06 ± 10.92 , all $P < 0.01$]. The above results indicated that SLPI could inhibit the inflammatory response of HK2 cells induced by LPS. The expressions of key apoptosis proteins Bax and caspase-3 in LPS-HK2 cells in the gene knockdown group were significantly higher than those in the negative control group [Bax protein (Bax/GAPDH): 1.38 ± 0.12 vs. 1.00 ± 0.10 , caspase-3 protein (caspase-3/GAPDH): 1.44 ± 0.15 vs. 1.00 ± 0.11 , both $P < 0.05$], and Bcl-2 expression was significantly decreased (Bcl-2/GAPDH: 0.83 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$), the above results indicated that SLPI could inhibit the apoptosis of cells in the inflammatory response. **Conclusion** SLPI can inhibit the inflammatory response and apoptosis of HK2 cells induced by LPS, which may be involved in the protective mechanism of renal tubular cells in the response to sepsis, and is a potential target for the treatment of sepsis-associated AKI.

[Key words] Acute kidney injury; Sepsis; Secretory leukocyte peptidase inhibitor

Fund program: Scientific Research Project of Anhui Provincial Health Commission (AHWJ2021b092); Tongling Science and Technology Planning Project of Anhui Province (20200203041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210903-01315

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是重症患者常见并发症。脓毒症或感染性休克通常伴随器官功能失调, 而 AKI 是脓毒症早期最常见的器官功能损伤^[1]。大约有 51% 的脓毒症患者发生 AKI, 而脓毒症相关性 AKI 患者的病死率高达 41%^[2]。目前对于发生 AKI 的患者, 除了积极治疗原发病以外, 尚无针对性的治疗方法。究其原因还是目前尚未充分阐明 AKI 发生的潜在机制。因此, 阐明 AKI 的潜在发病机制有助于寻找 AKI 潜在的治疗方法。AKI 的发生通常有明确的重症原发病, 但多数情况下原发病难以被迅速控制或逆转, 意味着探索 AKI 的损伤和保护机制有重要的临床实践意义。

任何疾病的发生发展均离不开细胞分子水平的变化。有些基因的差异表达可以促进 AKI 发生, 而有些基因的差异表达也可以起到保护和延缓 AKI 的作用。随着生物信息学的发展, 有不少研究者从公共数据库中挖掘出可信度更高的结论。刘垚等^[3]通过基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 寻找到脓毒症中内毒素耐受潜在关键基因。莫均荣等^[4]通过 GEO 数据库构建了脓毒症相关竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 网络, 该网络能为脓毒症长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、微小 RNA (micro RNA, miRNA) 相关研究提供参考。本研究以 GSE30718^[5] 和 GSE53773^[6]

两个 GEO 数据集为起点进行基因表达谱分析, 筛选出两个数据集差异表达一致的基因, 即分泌性白细胞蛋白酶抑制因子 (secretory leukocyte peptidase inhibitor, SLPI) 进行深入研究。由于脓毒症相关性 AKI 临床样本难以获取, 无法用临床样本验证 SLPI 的表达差异, 因此选用两个数据集进行相互验证, 以提高分析结果的可信度。虽然肾移植术后 AKI 发病机制与脓毒症相关性 AKI 发病机制有所不同, 但肾移植术后 AKI 数据可用于筛选基因, 而筛选出的基因是否介入脓毒症相关性 AKI 发病机制则可通过实验进行验证。本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人近端肾小管上皮细胞株 HK2 模型验证 SLPI 对炎症反应及细胞凋亡的影响, 为脓毒症相关性 AKI 的防治提供可能的思路。

1 材料与方法

1.1 伦理学: 本实验属于安徽省卫生健康委科研项目 (AHWJ2021b092) 和安徽省铜陵市科技计划项目 (20200203041) 内容, 符合伦理学要求, 通过铜陵市人民医院医学伦理委员会审批 (审批号: 2022006)。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 公开数据库: 差异表达分析使用 GEO 数据库的 GSE30718^[5] 和 GSE53773^[6] 两个数据集, 这两个数据集是对移植肾进行的术前、术后肾组织芯片分析。GSE30718 记录了加拿大阿尔伯塔大学 (2004 年

9 月至 2007 年 10 月)和美国伊利诺伊大学(2006 年 11 月至 2007 年 2 月)肾移植相关研究中 19 例正常肾样本与 28 例 AKI 肾活检样本芯片数据。GSE53773 数据集记录了 18 例肾移植术后 0 h 和术后指定时间点常规活检的芯片数据(共计 36 个肾移植手术肾活检样本);18 例肾移植患者中有 8 例发生 AKI。

1.2.2 差异基因分析:使用 R 语言的 limma 包分别对 GSE30718、GSE53773 数据集进行差异基因分析,将 $P < 0.05$ 、 $|\log_2$ 差异倍数(fold change, FC)| > 0.1 设为差异表达阈值,满足此条件的基因被认为是差异表达基因。选取两个数据集中差异表达趋势相同的基因,使用 R 语言的 ROCR 包绘制受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线),计算差异表达基因在 GSE30718 和 GSE53773 数据集中预测 AKI 的 ROC 曲线下面积(area under the ROC curve, AUC),将 AUC > 0.8 设为阈值,筛选潜在研究基因作为细胞验证实验的目的基因。

1.3 细胞验证实验

1.3.1 细胞来源:HK2 细胞购自中国科学院上海细胞库。使用含 10% 血清的 DMEM-F12 培养基(美国 HyClone 公司)培养细胞,培养液不含青霉素和链霉素,在 5% CO_2 的 37℃ 培养箱中孵育。

1.3.2 细胞模型制备:将 HK2 细胞接种在 6 孔板或 96 孔板中,用含血清培养基培养至对数期,更换为 LPS(美国 Sigma 公司)浓度分别为 1、5、10 mg/L 的含血清培养基孵育 6 h,并设空白对照组。检测不同浓度下细胞活性变化,选择最佳浓度进行后续实验。

1.3.3 细胞转染:结合 GSE30718 和 GSE53773 数据集的差异基因分析结果,并通过细胞炎症模型验证筛选出目的基因,通过小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)在 LPS-HK2 细胞模型中敲减目的基因。目的基因 siRNA 及阴性对照 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司提供,引物序列设计合成均由吉玛公司完成,并使用吉玛公司提供的转染试剂。

1.3.4 分组设计及处理:将细胞分为空白对照组、LPS 模型组、基因阴性对照组和基因敲减组。空白对照组不给予任何处理;LPS 模型组在培养基中加入 LPS 10 mg/L 孵育 6 h;基因敲减组和基因阴性对照组分别使用 siRNA 技术对 LPS-HK2 细胞中经生物信息学分析得出的目的基因进行敲减或给予基因阴性对照。

1.3.5 检测指标及方法

1.3.5.1 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应

(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR):用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,取 1 μg 总 RNA 作为模板进行反转录;采用 SYBR Green 法进行荧光定量 PCR,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参。引物设计合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因表达量。

1.3.5.2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting):提取细胞蛋白,定量后进行电泳、转膜、封闭,加入一抗稀释液(均为 1:1 000),在 4℃ 环境下孵育 12 h。用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)洗膜 3 次 $\times 5 \text{ min}$;加入二抗,常温孵育 1 h;随后用 TBST 洗膜 3 次 $\times 5 \text{ min}$ 。用电化学发光显色液 A 和 B 按等体积方法混合;显影、曝光后,用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

1.3.5.3 四甲基偶氮唑盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测细胞活性:细胞接种于 96 孔板,细胞密度为每孔 5 000 个。分别于每个实验孔添加 20 μL MTT 试剂(5 g/L,美国 Sigma 公司)孵育 4 h;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗 2 遍;去除 PBS 后添加 100 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO);最后用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(absorbance, A)值,以反映细胞活性。

1.3.5.4 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定炎症因子水平:遵循试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司)说明书的操作步骤,采用 ELISA 法检测细胞培养上清液中白细胞介素(interleukins, IL-6、IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量。

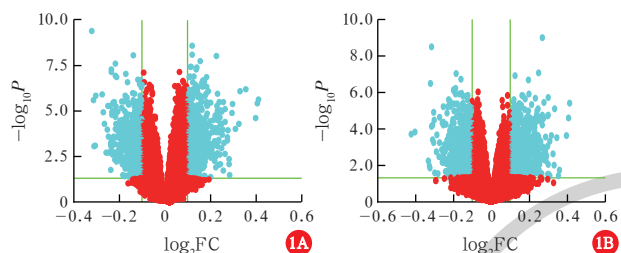
1.4 统计学分析:统计分析使用 R 语言完成。所有计量资料均呈正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用非配对 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较使用 Tukey HSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 SLPI 在 GSE30718、GSE53773 数据集表达趋势一致:以 GSE30718 和 GSE53773 两个数据集为起点进行基因谱表达分析,筛选出两个数据集差异表达一致的基因进行研究。应用 GSE30718 数据集进行差异分析后得到 1 368 个差异基因,其中 603 个下调,765 个上调(图 1A);应用 GSE53773 数据集进

行差异分析后得到 1 841 个差异基因,其中 746 个下调,1 095 个上调(图 1B)。进一步分析发现,这两个数据集间只有 325 个基因呈现相同的表达趋势,其中 144 个显著下调,181 个显著上调;SLPI 在两个数据集中表达差异的统计学意义均较大,故选择 SLPI 作为目的基因进行后续实验。



注: GSE30718 和 GSE53773 为从基因表达数据库中筛选出的急性肾损伤(AKI)相关数据集,FC 为差异倍数;绿线代表差异基因阈值线,蓝色圆点代表差异基因,红色圆点代表非差异基因

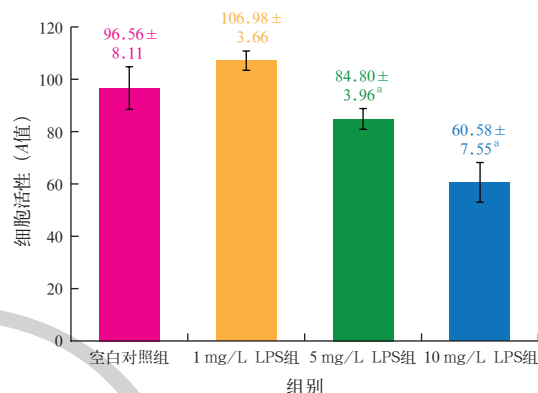
图 1 GSE30718(A)和 GSE53773(B)数据集中 AKI 样本与非 AKI 样本差异表达基因的火山图

2.1.2 SLPI 在 AKI 肾组织表达显著上调: GSE30718 和 GSE53773 数据集分析显示(图 2A), AKI 组肾组织 SLPI 表达量较非 AKI 组显著上调(均 $P < 0.01$)。ROC 曲线分析显示(图 2B),在 GSE30718 和 GSE53773 数据集中,SLPI 表达量对 AKI 的诊断效能均较高,AUC 分别为 0.83 和 0.92。

2.2 细胞验证实验

2.2.1 HK2 细胞炎症模型中的基因验证: 与空白对照组比较,1 mg/L LPS 组细胞活性无明显差异,然而 5 mg/L LPS 组和 10 mg/L LPS 组细胞活性则显著下降(均 $P < 0.05$;图 3),最终选择 10 mg/L 进行后续实验。结果证实,LPS 模型组细胞培养液中炎症因子水平较空白对照组明显升高(均 $P < 0.01$;图 4A),说明

LPS-HK2 细胞模型制备成功;同时细胞中 SLPI 表达较空白对照组显著升高($P < 0.01$;图 4B),与生物信息学分析结果一致。

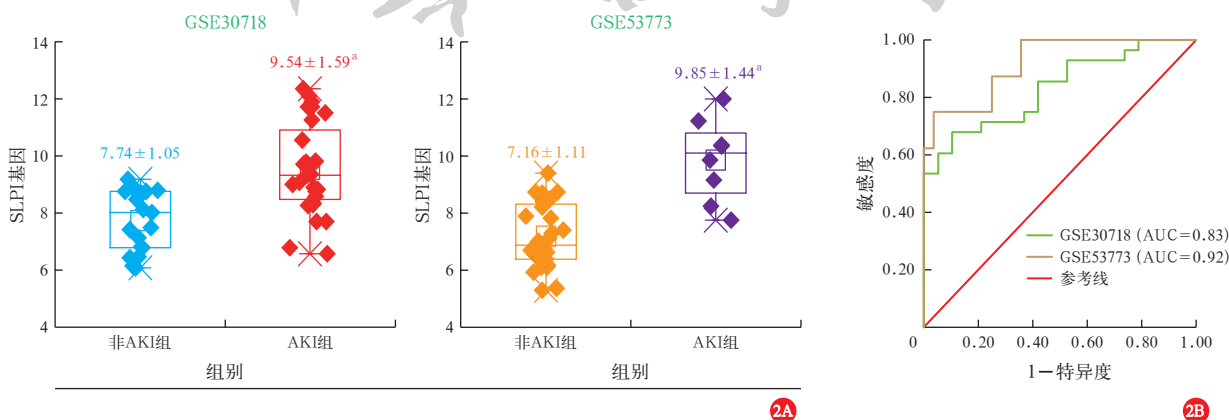


注: LPS 为脂多糖, HK2 细胞为人近端肾小管上皮细胞株;与空白对照组比较, $^a P < 0.05$

图 3 各组 HK2 细胞活性比较

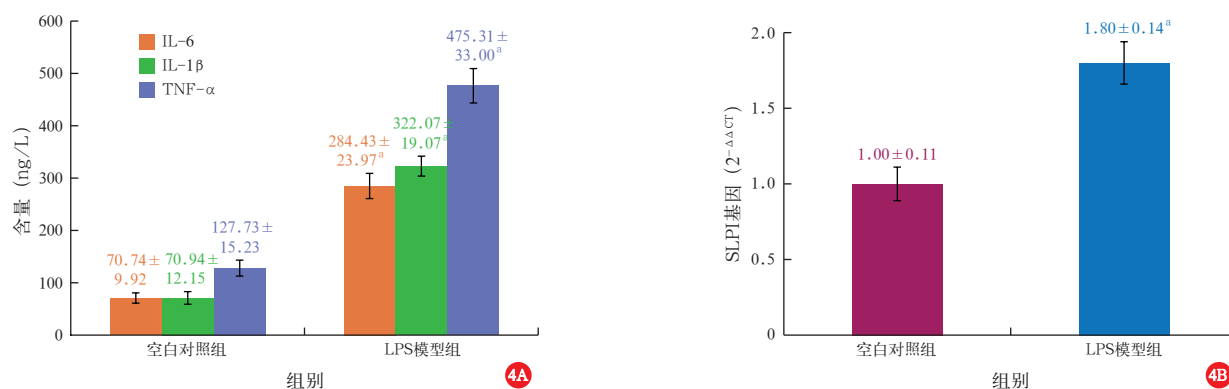
2.2.2 SLPI 可抑制 LPS-HK2 细胞炎症反应: 为了分析 SLPI 在细胞生物活动中是否发挥作用,用 siRNA 技术对 LPS-HK2 细胞中的 SLPI 表达进行沉默。结果显示,siRNA 能够显著抑制 LPS-HK2 细胞中 SLPI 基因表达;而基因阴性对照则对 SLPI 基因表达无显著影响(图 5A)。基因敲减组 LPS-HK2 细胞培养液中炎症因子表达较阴性对照组显著上调(均 $P < 0.01$;图 5B)。证实 SLPI 在 LPS 介导 HK2 细胞的炎症反应中可能起到保护作用。

2.2.3 SLPI 可抑制 LPS-HK2 细胞凋亡(图 6): 研究 SLPI 对 LPS-HK2 细胞凋亡的影响证实,SLPI 基因敲减组凋亡关键蛋白 Bax 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)表达均较阴性对照组显著增加,Bcl-2 表达较阴性对照组显著降低(均 $P < 0.05$)。说明 SLPI 能显著抑制 LPS 介导的 HK2 细胞凋亡反应。



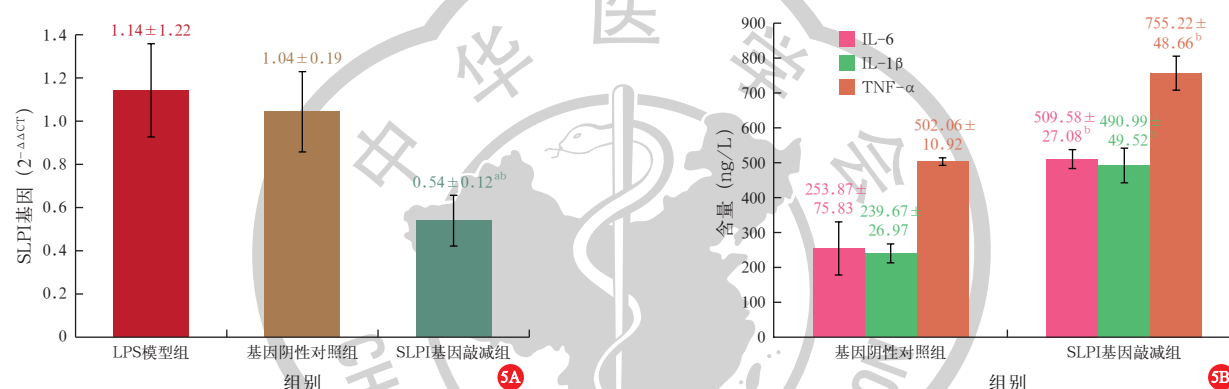
注: GSE30718 和 GSE53773 为从基因表达数据库中筛选出的急性肾损伤(AKI)相关数据集,SLPI 为分泌性白细胞蛋白酶抑制因子,ROC 曲线为受试者工作特征曲线,AUC 为 ROC 曲线下面积;与非 AKI 组比较, $^a P < 0.01$

图 2 GSE30718 和 GSE53773 数据集中 AKI 样本与非 AKI 样本 SLPI 表达比较(A)及 SLPI 预测 AKI 的 ROC 曲线(B)



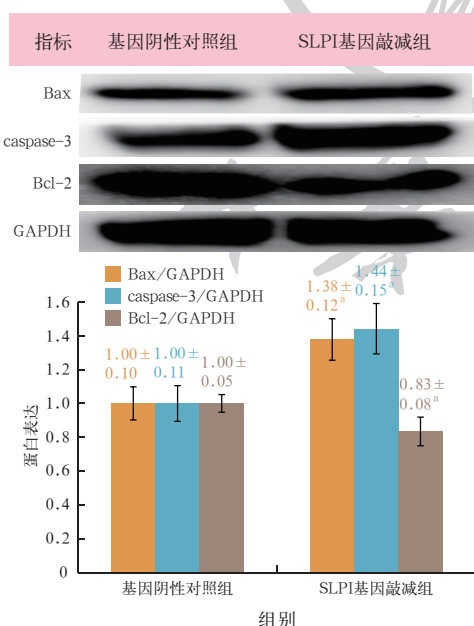
注: LPS 为脂多糖, HK2 细胞为人近端肾小管上皮细胞株, IL-6 为白细胞介素-6, IL-1β 为白细胞介素-1β, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, SLPI 为分泌性白细胞蛋白酶抑制因子; 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.01

图 4 两组 HK2 细胞培养液中炎症因子水平(A)及细胞中 SLPI 基因表达(B)比较



注: LPS 为脂多糖, HK2 细胞为人近端肾小管上皮细胞株, SLPI 为分泌性白细胞蛋白酶抑制因子, IL-6 为白细胞介素-6, IL-1β 为白细胞介素-1β, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α; 与 LPS 模型组比较, ^a*P* < 0.01; 与基因阴性对照组比较, ^b*P* < 0.01

图 5 各组 LPS-HK2 细胞中 SLPI 基因表达(A)及细胞培养液中炎症因子水平(B)比较



LPS 为脂多糖, HK2 细胞为人近端肾小管上皮细胞株, Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, SLPI 为分泌性白细胞蛋白酶抑制因子, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与基因阴性对照组比较, ^a*P* < 0.05

图 6 Western blotting 检测各组 LPS-HK2 细胞中凋亡关键蛋白表达

3 讨论

目前临床对 AKI 的研究难点在于组织样本难以获取。因为不会对正常肾脏进行活检,故而在 AKI 的基因学研究中很难获取“正常与 AKI”的组织样本。幸运的是,肾移植手术时会进行常规肾活检,既有术前健康肾脏活检样本,也有移植后肾脏活检样本。移植后的肾脏有一部分发生了 AKI,而另一部分没有发生 AKI,这些样本为 AKI 的深入研究提供了可能。虽然肾移植术后 AKI 发病机制和脓毒症相关性 AKI 发病机制有所不同,但肾移植术后 AKI 数据库可用于筛选基因,而筛选出的基因是否参与脓毒症相关性 AKI 发病机制可以通过实验证实。

本研究通过 GEO 数据库发现,SLPI 在 AKI 样本中的表达量显著高于非 AKI 样本,且表达的差异在 GSE30718 和 GSE53773 数据集中趋势相同,ROC 曲线分析显示该基因在这两个数据集中对 AKI 都具有良好的诊断效能。为了进一步验证 SLPI 在 AKI 中是否发挥作用,本研究通过细胞实验加以验证。

本研究在细胞实验中对 HK2 细胞进行了 LPS

诱导炎症制模,发现 LPS 为 10 mg/L 时炎症反应最明显,且制模后 SLPI 表达较空白对照组显著升高,与生物信息学分析结论一致;LPS-HK2 细胞培养液中炎症因子水平也较空白对照组显著升高。本研究用 siRNA 对 LPS-HK2 细胞中的 SLPI 进行敲减,发现细胞培养液中炎症因子含量上升,证实高表达 SLPI 能减轻 LPS-HK2 细胞炎症反应。研究表明, Bax 和 caspase-3 可促进凋亡发生,而 Bcl-2 可抑制凋亡发生^[7-9]。本研究检测了 SLPI 与 Bax、caspase-3、Bcl-2 等凋亡关键蛋白间的关系,结果显示,敲减 SLPI 后, LPS-HK2 细胞中 Bax、caspase-3 显著上调, Bcl-2 显著下调,证实 SLPI 参与了炎症细胞的凋亡调节。

SLPI 是相对分子质量约 12 000 的阳离子蛋白,是一类乳清酸性蛋白^[10]。SLPI 的主要角色为抗水解酶,外分泌的 SLPI 可对抗黏膜分泌的水解酶,从而保护黏膜不受水解酶的损伤^[11]。研究表明,在人类单核白细胞中 SLPI 能抑制三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)介导的 IL-1 β 成熟^[12]。Tateosian 等^[13]在肺结核研究中发现,血清 SLPI 的表达受血清 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 水平的影响,而在肺结核中血清 SLPI 主要来自外周血单核细胞。提示 SLPI 在炎症反应中可能扮演了重要角色。SLPI 是中性粒细胞弹性蛋白酶的活性抑制物,这意味着它能延缓免疫损伤。另外有报道指出, SLPI 能抑制免疫球蛋白 G 免疫复合物引起的核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路激活^[14],从而缓解细胞凋亡。在另一项肺泡上皮细胞研究中,研究人员发现 SLPI 也能够起到抑制 NF- κ B 通路的作用^[15]。余璐等^[16]研究表明,姜黄素能够增加肺炎链球菌感染的人肺上皮细胞株 BEAS-2B 中 SLPI 的表达,减少 TNF- α 、IL-1 β 的分泌,与本研究结论类似。薛继红等^[17]发现,重症肺炎患儿 SLPI 水平明显低于健康对照组, NF- κ B 水平明显高于健康对照组;治疗后,重症肺炎组 SLPI 水平较治疗前显著升高。重症肺炎患儿 SLPI 水平下降可能是由于 SLPI 基础水平较低,导致重症肺炎易感。本研究生物信息学分析显示, SLPI 在 AKI 样本中显著上调,且有良好的诊断效能;结合细胞实验和其他文献认为, SLPI 上调可能是肾上皮细胞的自我保护反应;细胞实验证实, SLPI 能在 LPS-HK2 细胞炎症反应中起到保护作用。

综上,SLPI 能抑制 LPS 诱导的 HK2 细胞炎症反应和凋亡,可能参与肾小管细胞在脓毒症反应中的保护机制,成为脓毒症相关性 AKI 治疗的潜在靶点。

未来研究方向:①肾脏 SLPI 基础水平是否导致患者在脓毒症情况下更容易发生 AKI;②有研究者指出,人重组 SLPI 对心肌细胞缺血/再灌注损伤有很好的疗效^[18-19],那么在脓毒症相关性 AKI 中人重组 SLPI 是否也有预防或治疗效果,值得进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bagshaw SM, George C, Bellomo R. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation [J]. Crit Care, 2008, 12 (2): R47. DOI: 10.1186/cc6863.
- [2] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study [J]. Crit Care Med, 2006, 34 (2): 344-353. DOI: 10.1097/01.ccm.0000194725.48928.3a.
- [3] 刘垚, 刘逸, 张小禾, 等. 甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2 促进小鼠巨噬细胞内毒素耐受形成的研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (4): 472-477. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201106-00705.
- [4] 莫均荣, 张振辉, 陈美婷, 等. 基于 GEO 芯片和生物信息学分析构建脓毒症相关 ceRNA 网络 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (4): 427-432. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210205-00211.
- [5] Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23 (5): 948-958. DOI: 10.1681/ASN.2011090887.
- [6] Willingseder J, Sunzenauer J, Toronyi E, et al. Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles [J]. PLoS One, 2014, 9 (8): e104164. DOI: 10.1371/journal.pone.0104164.
- [7] Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak [J]. Nature, 1995, 374 (6524): 736-739. DOI: 10.1038/374736a0.
- [8] D'Orsi B, Mateyka J, Prehn JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok [J]. Neurochem Int, 2017, 109: 162-170. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.03.010.
- [9] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases [J]. Cell Death Differ, 2015, 22 (4): 526-539. DOI: 10.1038/cdd.2014.216.
- [10] Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, et al. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer [J]. Lancet Oncol, 2006, 7 (2): 167-174. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70579-4.
- [11] Lee CH, Igarashi Y, Hohman RJ, et al. Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway [J]. Am Rev Respir Dis, 1993, 147 (3): 710-716. DOI: 10.1164/ajrcm/147.3.710.
- [12] Zakrzewicz A, Richter K, Zakrzewicz D, et al. SLPI inhibits ATP-mediated maturation of IL-1 β in human monocytic leukocytes: a novel function of an old player [J]. Front Immunol, 2019, 10: 664. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00664.
- [13] Tateosian NL, Pasquinelli V, Hernández Del Pino RE, et al. The impact of IFN- γ receptor on SLPI expression in active tuberculosis: association with disease severity [J]. Am J Pathol, 2014, 184 (5): 1268-1273. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.006.
- [14] Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, et al. Secretory leukoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (37): 33648-33653. DOI: 10.1074/jbc.M203710200.
- [15] Mikami Y, Iwase T, Komiyama Y, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits expression of polymeric immunoglobulin receptor via the NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Immunol, 2015, 67 (2 Pt B): 568-574. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.07.021.
- [16] 余璐, 林立, 李海燕, 等. 姜黄素对肺炎链球菌诱导 BEAS-2B 细胞 SLPI、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34 (2): 321-327. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2018.02.021.
- [17] 薛继红, 冯霞, 冯孝强. 不同程度肺炎患儿分泌型白细胞蛋白酶抑制剂与核因子- κ B 水平变化及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12 (19): 2870-2872. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.19.023.
- [18] Kongpol K, Nernpermpisooth N, Prompant E, et al. Endothelial-cell-derived human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury [J]. Biomolecules, 2019, 9 (11): 678. DOI: 10.3390/biom9110678.
- [19] Prompant E, Nernpermpisooth N, Sanit J, et al. Overexpression and pre-treatment of recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor (rhSLPI) reduces an *in vitro* ischemia/reperfusion injury in rat cardiac myoblast (H9c2) cell [J]. Biomol Concepts, 2018, 9 (1): 17-32. DOI: 10.1515/bmc-2018-0004.

(收稿日期: 2021-09-03)