

敲低RIP3对缺氧/复氧诱导人肾小管上皮HK2细胞自噬、细胞焦亡和铁死亡的影响

何国斌, 王 煊

(河南省新乡市中心医院肾内科, 河南 新乡 453000)

[摘要] **目的:** 探讨敲低受体相互作用蛋白激酶3 (RIP3) 对缺氧复氧 (H/R) 诱导下人肾小管上皮HK2细胞自噬、焦亡和铁死亡的影响。**方法:** 将慢病毒干扰载体质粒 shRIP3 和阴性对照慢病毒干扰载体质粒 shNC 分别转染至 HK2 细胞中, 分为 shRIP3 组和 shNC 组, 另以正常培养未转染的 HK2 细胞作为空白组, 转染 48 h 后, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法验证慢病毒转染效果。将 HK2 细胞分为对照组、H/R 组、shNC+H/R 组和 shRIP3+H/R 组。CCK-8 法检测各组 HK2 细胞存活率, 免疫荧光染色法检测各组细胞中微管结合蛋白 1 轻链 (LC) 3B 和含核苷酸结合结构域富亮氨酸重复序列 (NLR) 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 蛋白荧光强度, Western blotting 法检测各组 HK2 细胞中 LC3 II、LC3 I、Beclin1、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-1、膜穿孔蛋白 D (GSDMD)、白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平, 试剂盒检测各组细胞中铁离子 (Fe²⁺) 水平。**结果:** 与空白组和 shNC 组比较, shRIP3 组 HK2 细胞中 RIP3 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。CCK-8 法检测, 与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色法检测, 与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 LC3B 蛋白荧光强度明显降低 ($P < 0.05$), NLRP3 蛋白荧光强度明显升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 LC3B 蛋白荧光强度明显升高 ($P < 0.05$), NLRP3 蛋白荧光强度明显降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 法检测, 与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 LC3 II/LC3 I 比值明显降低 ($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 LC3 II/LC3 I 比值明显升高 ($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 Fe²⁺ 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 Fe²⁺ 水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 靶向敲低 RIP3 可诱导 H/R 诱导人肾小管上皮 HK2 细胞自噬, 抑制细胞焦亡和减轻铁死亡。**[关键词]** 人肾小管上皮 HK2 细胞; 缺氧/复氧; 受体相互作用蛋白激酶 3; 自噬; 焦亡; 铁死亡
[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-12-06

[基金项目] 河南省卫健委医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20220988)

[作者简介] 何国斌 (1980—), 男, 河南省新乡市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事肾脏病诊疗方面的研究。

[通信作者] 王 煊, 副主任医师 (E-mail: 57033676@qq.com)

Effect of knockdown of RIP3 on autophagy, pyroptosis, and ferroptosis of hypoxia/reoxygenation-induced human renal tubular epithelial HK2 cells

HE Guobin, WANG Huan

(Department of Nephrology, Central Hospital, Xinxiang City, Henan Province, Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of knockdown of receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) on autophagy, pyroptosis, and ferroptosis in the human renal tubular epithelial HK2 cells under hypoxia/reoxygenation (H/R) conditions. **Methods:** The lentiviral interference vector plasmid shRIP3 and negative control lentiviral interference vector plasmid shNC were transfected into the HK2 cells and the HK cells were divided into shRIP3 group and shNC group, and the normal cultured untransfected HK2 cells were regarded as blank group. After 48 h of transfection, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to verify the lentiviral transfection efficiencies. The HK2 cells were divided into control group, H/R group, shNC+H/R group, and shRIP3+H/R group. CCK-8 method was used to detect the survival rates of the HK2 cells in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the fluorescence intensities of light chain 3 (LC3B) and NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) proteins in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of LC3 II, LC3 I, Beclin1, Caspase-1, Gasdermin D (GSDMD), interleukin (IL)-1 β , and IL-18 proteins in the HK2 cells in various groups; Kits were used to detect the ferri ion (Fe²⁺) levels in the cells in various groups. **Results:** Compared with blank group and shNC group, the expression levels of RIP3 mRNA and protein in the HK2 cells in shRIP3 group were decreased ($P < 0.05$). The CCK-8 method results showed that compared with control group, the survival rate of the HK2 cells in H/R group was decreased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the survival rate of the HK2 cells in shRIP3+H/R group was increased ($P < 0.05$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the fluorescence intensity of LC3B protein in the HK2 cells in H/R group was decreased ($P < 0.05$), and the fluorescence intensity of NLRP3 protein was increased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the fluorescence intensity of LC3B protein in the HK2 cells in shRIP3+H/R group was increased ($P < 0.05$), and the fluorescence intensity of NLRP3 protein was decreased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the ratio of LC3 II/LC3 I and the expression level of Beclin1 protein in the HK2 cells in H/R group were decreased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the ratio of LC3 II/LC3 I and expression level of Beclin1 protein in the HK2 cells in shRIP3+H/R group were increased ($P < 0.05$); compared with control group, the expression levels of Caspase-1, GSDMD, IL-1 β , and IL-18 proteins in the HK2 cells in H/R group were increased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the expression levels of Caspase-1, GSDMD, IL-1 β , and IL-18 proteins in the HK2 cells in shRIP3+H/R group were decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression levels of GPX4 and SLC7A11 proteins in the HK2 cells in H/R group were decreased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the expression levels of GPX4 and SLC7A11 proteins in the HK2 cells in shRIP3+H/R group were increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the Fe²⁺ level in the HK2 cells in H/R group was increased ($P < 0.05$); compared with H/R group, the Fe²⁺ level in the HK2 cells in shRIP3+H/R group was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Targeted knockdown of RIP3 can induce the autophagy, inhibit the pyroptosis, and reduce the ferroptosis of the human renal tubular epithelial HK2 cells induced by H/R.

KEYWORDS Human renal tubular epithelial HK2 cells; Hypoxia/reoxygenation; Receptor-interacting protein kinase 3; Autophagy; Pyroptosis; Ferroptosis

急性肾损伤是一种急性危重肾脏疾病,通常由肾缺血/再灌注、肾毒素、肾切除术和脓毒症引起^[1]。目前,重症监护病房患者急性肾损伤的发病率和死亡率高达50%以上^[2]。肾缺血/再灌注损伤作为急性肾损伤的常见原因之一,主要由于肾脏局部缺血后恢复供血而造成不可逆性肾功能损伤,其发生和进展与多种分子事件有关,如离子蓄积、线粒体功能障碍、氧化应激、炎症及细胞凋亡^[3-4]。因此,探讨抑制肾缺血/再灌注损伤的有效治疗方法对于预防急性肾损伤较为重要。

受体相互作用蛋白激酶(receptor interacting protein kinase, RIP) 3是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在介导炎症和细胞死亡中起重要的作用。研究^[5]显示:RIP3促进脓毒症诱导的小鼠急性肾损伤,并在脂多糖处理的近端肾小管上皮细胞(renal proximal tubular epithelial cells, PTEC)中激活,通过促进氧化应激和线粒体功能障碍加重肾小管损伤。此外,抑制RIP3可以通过恢复脓毒性急性肾损伤期间肾小管细胞的自噬降解起到肾脏保护作用,RIP3可能参与急性肾损伤的发生发展^[6]。本研究通过缺氧复氧(hypoxia reoxygenation, H/R)诱导人肾小管上皮细胞HK2在体外模拟肾缺血/再灌注模型,探讨RIP3敲低后对H/R诱导的人肾小管上皮HK2细胞的影响及其作用机制,为急性肾损伤的临床防治提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人肾小管上皮细胞HK2来源于中国科学院细胞库。胎牛血清、1%青-链霉素及DMEM培养基购于美国Hyclone公司,转染试剂Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司,TRIzol、反转录和铁SYBR Green定量检测试剂盒购于日本TaKaRa公司,RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、超敏ECL试剂液和DAPI染料购于上海碧云天生物技术有限公司,CCK-8试剂购于北京康为世纪公司,Triton X-100购于北京百奥莱博科技有限公司,铁离子(ferri ion, Fe²⁺)检测试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司,兔抗甘油醛3磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体、兔抗RIP3多克隆抗体、兔抗微管结合蛋白1轻链

(microtubule binding protein 1 light chain, LC) 3B多克隆抗体、兔抗Beclin1单克隆抗体、兔抗含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)-1多克隆抗体、兔抗膜穿孔蛋白D(gasdermin-D, GSDMD)单克隆抗体、兔抗白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 单克隆抗体、兔抗IL-18单克隆抗体、兔抗谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)单克隆抗体、兔抗溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)多克隆抗体、含核苷酸结合结构域富亮氨酸重复序列(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat, NLR)家族Pyrin域蛋白3(NLR family Pyrin-domain protein 3, NLRP3)和多克隆抗体及辣根过氧化物酶/花青3(cyanine 3, Cy3)荧光标记的山羊抗兔IgG抗体均购于英国Abcam公司。引物序列、慢病毒干扰载体质粒shRIP3和阴性对照慢病毒干扰载体质粒shNC由生工生物工程(上海)有限公司合成和构建。

1.2 细胞培养和转染 将HK2细胞置于含10%胎牛血清与1%青-链霉素混合溶液的DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂环境下培养,取对数生长期细胞用于实验。将慢病毒干扰载体质粒shRIP3和阴性对照慢病毒干扰载体质粒shNC分别转染至HK2细胞中,分为shRIP3组和shNC组,具体根据Lipofectamine 2000试剂盒说明书步骤执行。另以正常培养未转染的HK2细胞作为空白组,转染48 h后,收集细胞并加入新鲜完全培养基,采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法和Western blotting法验证慢病毒转染效果。

1.3 H/R细胞模型制备和分组 H/R建模方法^[7]:将HK2细胞置于低氧培养箱内(含94% N₂、5% CO₂和1% O₂)持续培养6 h后,再移至复氧培养箱内(含74% N₂、5% CO₂和21% O₂)中继续培养6 h,造成HK2细胞的H/R。将HK2细胞分为对照组(HK2细胞在正常环境下培养)、H/R组(HK2细胞进行H/R处理)、shNC+H/R组(HK2细胞转染阴性对照慢病毒干扰载体质粒shNC后进行H/R处理)和shRIP3+H/R组(HK2细胞转染慢病毒干扰载体质粒shRIP3后进行H/R处理)。

1.4 RT-qPCR法检测各组HK2细胞中RIP3 mRNA表达水平 各组HK2细胞中添加TRIzol试剂,按照说明书步骤提取总RNA,反转录合成cDNA。RT-qPCR法检测各组HK2细胞中RIP3 mRNA表达水平,参照SYBR Green法荧光定量PCR试剂盒说明书,加入各试剂与对应底物cDNA,反应体系体积共20 μ L,定量检测系统上设置两步法反应程序:95 $^{\circ}$ C下预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s、60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s,循环40次。实验重复检测3次,以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算RIP3 mRNA表达水平。引物序列:RIP3上游引物5'-GGACCTCAAGCCCTCTAACA-3',RIP3下游引物5'-ACCTCGGAGACAGCAGCATC-3'; β -actin上游引物5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3', β -actin下游引物5'-CTGGGTCATCTTTTCACGGT-3'。

1.5 Western blotting法检测各组HK2细胞中相关蛋白表达水平 使用RIPA裂解液提取各组HK2细胞总蛋白,BCA法进行定量。蛋白样品经100 $^{\circ}$ C金属浴煮沸变性后,将等量30 μ g蛋白加入凝胶孔,通过10% SDS-PAGE电泳分离并转移至硝酸纤维素膜。再将分离后的膜浸入5%脱脂奶粉中,室温封闭2 h,加入兔抗RIP3、LC3 II、LC3 I、Beclin1、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、GPX4和SLC7A11抗体作为一抗,均按1:1 000稀释,与膜在4 $^{\circ}$ C下共孵育。次日,取膜复温,TBST溶液洗涤后,加入对应标记的山羊抗兔IgG抗体作为二抗,按1:5 000稀释,与膜在室温下共孵育,2 h后再以TBST溶液洗膜,超敏ECL试剂液显色,曝光显影,图像扫描仪检测蛋白条带,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH作为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.6 CCK-8法检测各组细胞存活率 将HK2细胞按照每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂环境下过夜培养。各孔内添加10 μ L新鲜配制的CCK-8试剂,继续孵育2 h,采用酶标仪测定波长450 nm处各孔吸光度(A)值,并计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组A值-空白孔A值)/(对照组A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

1.7 免疫荧光染色法检测各组细胞中LC3B和NLRP3蛋白荧光强度 取各组HK2细胞进行细胞

爬片,4%多聚甲醛固定后,滴加0.5% Triton X-100渗透15 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后,5%山羊血清封闭1 h。甩去多余封闭液,加入兔抗LC3B多克隆抗体或兔抗NLRP3多克隆抗体分别作为一抗,均按照1:100稀释,4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。次日,PBS缓冲液再次清洗,加入Cy3荧光标记的二抗,按照1:200稀释,避光室温孵育2 h,DAPI染色液染核15 min,抗淬灭封片剂封片,在荧光显微镜下观察染色情况,摄取图像,采用Image J软件分析LC3B和NLRP3蛋白荧光强度。蛋白荧光强度=实验组蛋白荧光强度/对照组蛋白荧光强度。

1.8 采用试剂盒检测各组细胞中Fe²⁺水平 各组HK2细胞采用PBS缓冲液洗涤后加入200 μ L裂解液裂解细胞,置于摇床处理2 h。将缓冲液与4.5%高锰酸钾溶液按照1:1比例混匀,设置空白对照管、标准品管和样品管,根据试剂盒说明书添加各试剂和样品,混匀后于60 $^{\circ}$ C条件下孵育1 h,冷却至室温后,加入30 μ L Fe²⁺检测剂,室温下孵育30 min,采用酶标仪检测波长550 nm处各孔A值,绘制标准曲线并计算Fe²⁺水平。

1.9 统计学分析 采用GraphPad Prism7.0统计软件进行统计学分析并绘制图像。各组HK2细胞中RIP3 mRNA表达水平、细胞存活率、HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度和RIP3、Beclin1、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、GPX4及SLC7A11蛋白表达水平以及LC3 II/LC3 I比值均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

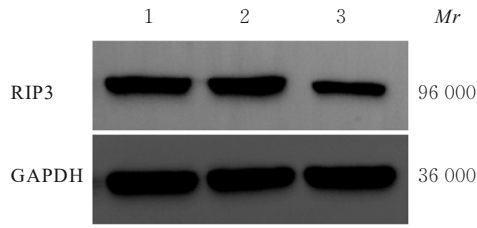
2 结果

2.1 各组HK2细胞中RIP3 mRNA和蛋白表达水平

与空白组(1.00 \pm 0.08和0.84 \pm 0.07)和shNC组(1.03 \pm 0.10和0.83 \pm 0.08)比较,shRIP3组HK2细胞中RIP3 mRNA和蛋白表达水平(0.24 \pm 0.02和0.26 \pm 0.02)均明显降低($P < 0.05$)。见图1。

2.2 各组HK2细胞存活率 与对照组比较,H/R组HK2细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与H/R组比较,shRIP3+H/R组HK2细胞存活率明显升高($P < 0.05$),shNC+H/R组HK2细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

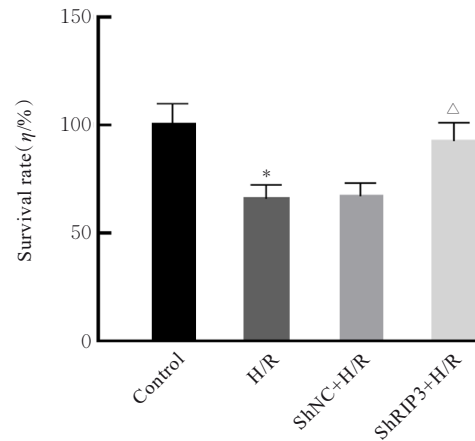
2.3 各组HK2细胞中LC3B和NLRP3蛋白荧光强度 与对照组(1.00 \pm 0.04和1.00 \pm 0.05)比



Lane 1: Blank group; Lane 2: ShNC group; Lane 3: ShRIP3 group.

图1 各组HK2细胞中RIP3蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of expressions of RIP3 protein in HK2 cells in various groups



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with H/R group.

图2 各组HK2细胞存活率

Fig. 2 Survival rates of HK2 cells in various groups

较, H/R组HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度 (0.24 ± 0.02) 明显降低 ($P < 0.05$), NLRP3蛋白荧光强度 (2.38 ± 0.25) 明显升高 ($P < 0.05$)。与H/R组比较, shRIP3+H/R组HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度 (1.23 ± 0.11) 明显升高 ($P < 0.05$), NLRP3蛋白荧光强度 (1.17 ± 0.13) 明显降低 ($P < 0.05$), shNC+H/R组HK2细胞中LC3B和NLRP3蛋白荧光强度 (0.25 ± 0.03 和

2.29 ± 0.25) 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图3和4。

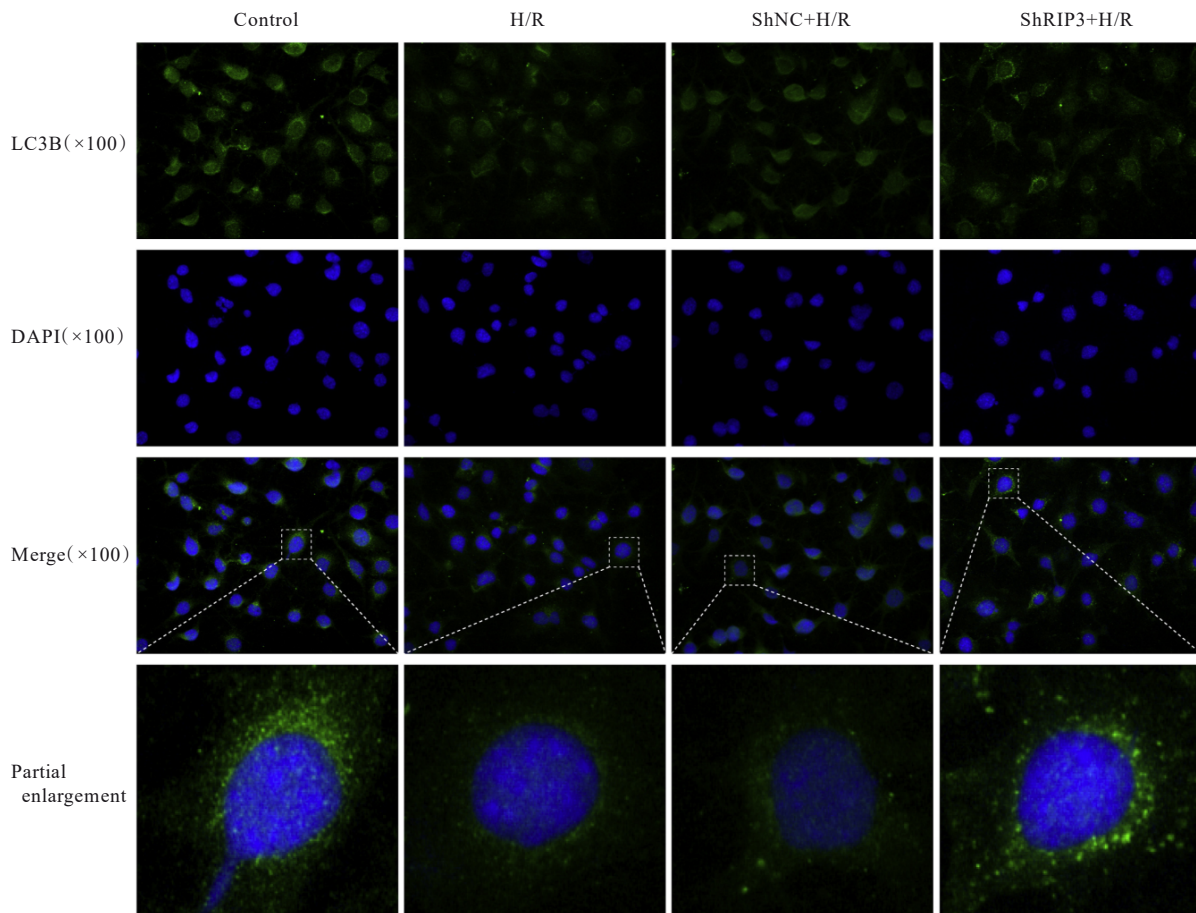


图3 各组HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度(免疫荧光)

Fig. 3 Fluorescence intensities of LC3B protein in HK2 cells in various groups(Immunofluorescence)

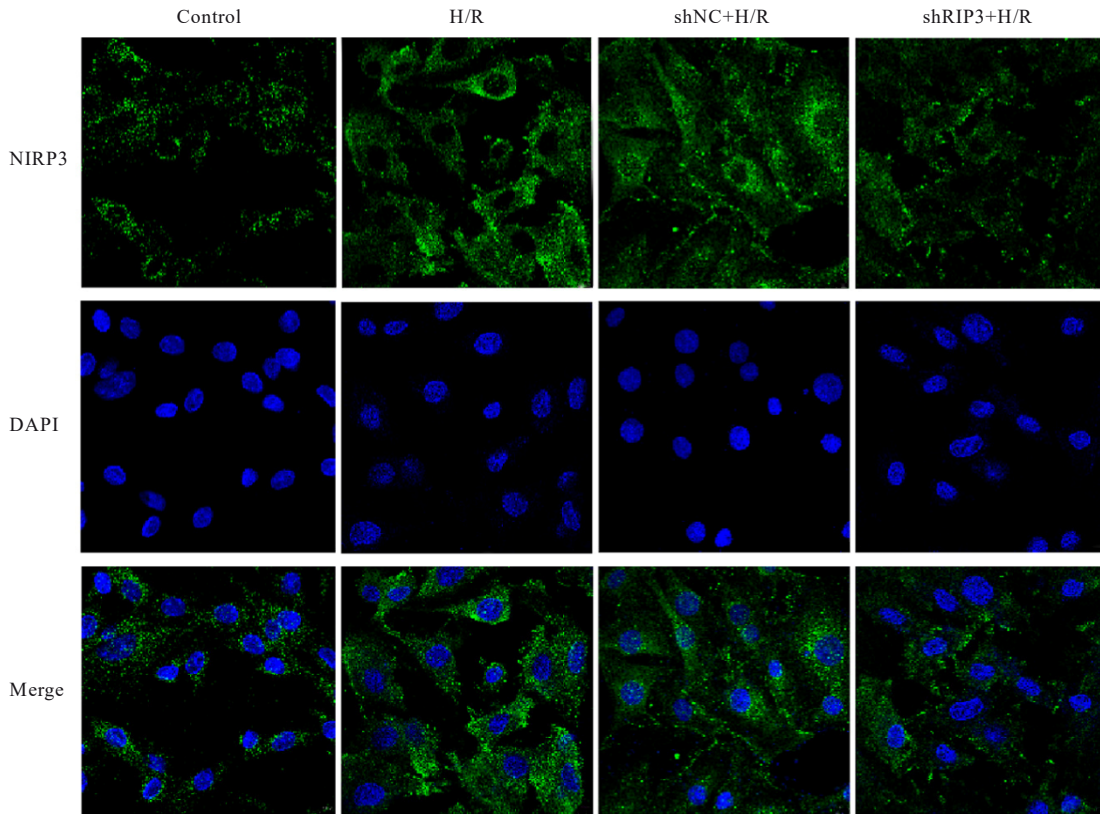
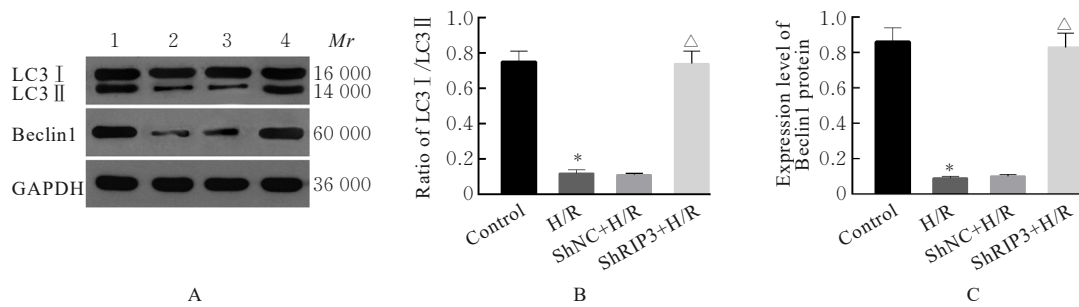


图4 各组 HK2 细胞中 NLRP3 蛋白荧光强度(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Fluorescence intensities of NLRP3 protein in HK2 cells in various groups(Immunofluorescence, ×200)

2.4 各组 HK2 细胞中 LC3 II /LC3 I 比值和 Beclin1 蛋白表达水平 与对照组比较, H/R 组 HK2 细胞中 LC3 II /LC3 I 比值明显降低 ($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较, shRIP3+H/R 组 HK2 细胞中 LC3 II /LC3 I 比

值明显升高 ($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), shNC+H/R 组 HK2 细胞中 LC3 II /LC3 I 比值和 Beclin1 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。



Lane 1: Control group; Lane 2: H/R group; Lane 3: ShNC+H/R group; Lane 4: ShRIP3+H/R group. * $P < 0.05$ compared with control group; [△] $P < 0.05$ compared with H/R group.

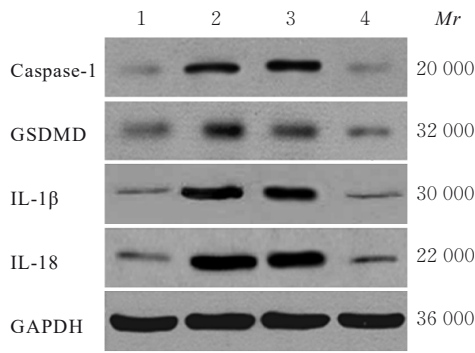
图5 各组 HK2 细胞中 LC3 II、LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B, C)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histograms(B, C) of expressions of LC3 II, LC3 I and Beclin1 proteins in HK2 cells in various groups

2.5 各组 HK2 细胞中 Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平 与对照组比较, H/R 组

HK2 细胞中 Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与 H/R 组

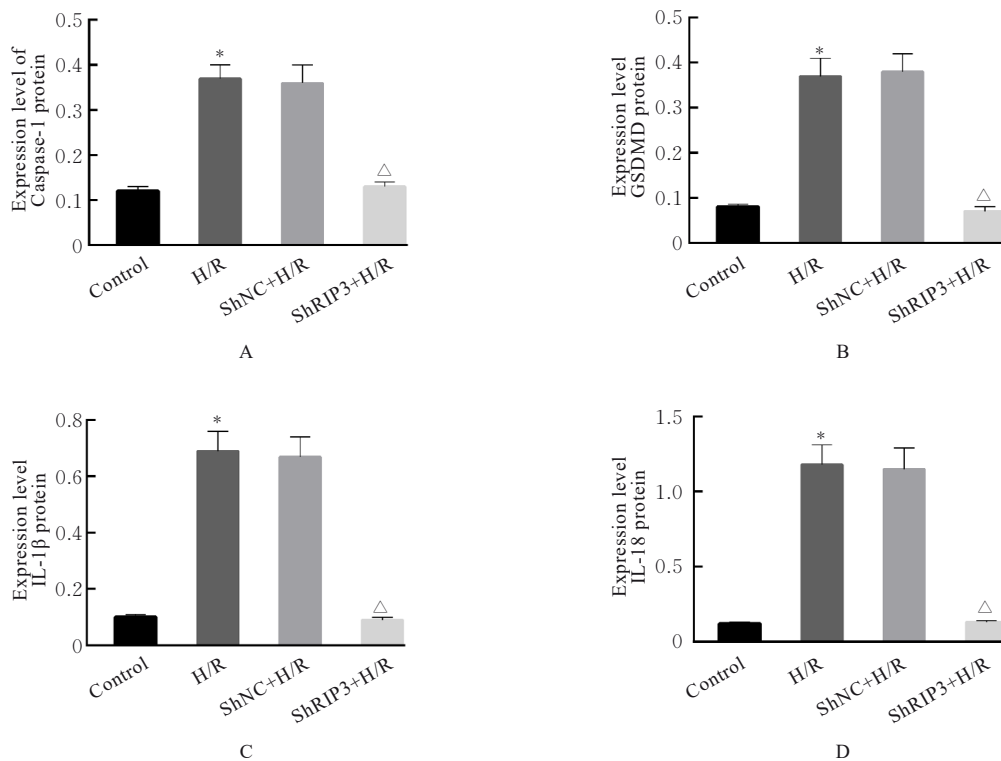
比较, shRIP3+H/R组HK2细胞中Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$), shNC+H/R组HK2细胞中Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图6和7。



Lane 1: Control group; Lane 2: H/R group; Lane 3: ShNC+H/R group; Lane 4: ShRIP3+H/R group.

图6 各组HK2细胞中Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白表达电泳图

Fig. 6 Electrophoregram of expressions of Caspase-1, GSDMD, IL-1 β , and IL-18 proteins in HK2 cells in various groups



A: Caspase-1; B: GSDMD; C: IL-1 β ; D: IL-18. * $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with H/R group.

图7 各组HK2细胞中Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白表达水平

Fig. 7 Expression levels of Caspase-1, GSDMD, IL-1 β , and IL-18 proteins in HK2 cells in various groups

2.6 各组HK2细胞中GPX4和SLC7A11蛋白表达水平

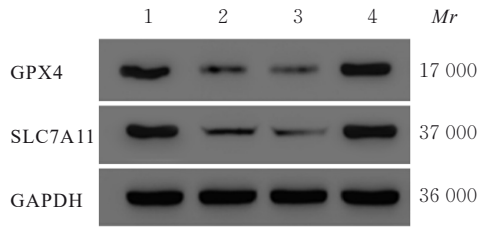
与对照组比较, H/R组HK2细胞中GPX4和SLC7A11蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。与H/R组比较, shRIP3+H/R组HK2细胞中GPX4和SLC7A11蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$), shNC+H/R组HK2细胞中GPX4和SLC7A11蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图8和9。

2.7 各组HK2细胞中Fe²⁺水平

与对照组 [(1.00 \pm 0.03) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] 比较, H/R组HK2细胞中Fe²⁺水平 [(1.67 \pm 0.19) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] 明显升高($P<0.05$)。与H/R组比较, shRIP3+H/R组HK2细胞中Fe²⁺水平 [(1.22 \pm 0.14) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] 明显降低($P<0.05$), shNC+H/R组HK2细胞中Fe²⁺水平 [(1.69 \pm 0.18) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] 差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

临床上, 急性肾损伤患者的肾功能迅速恶化, 表现为肾小球滤过率降低、体液和电解质失衡及代谢废物的积累, 给患者生命健康造成了严重威



Lane 1: Control group; Lane 2: H/R group; Lane 3: ShNC+H/R group; Lane 4: ShRIP3+H/R group.

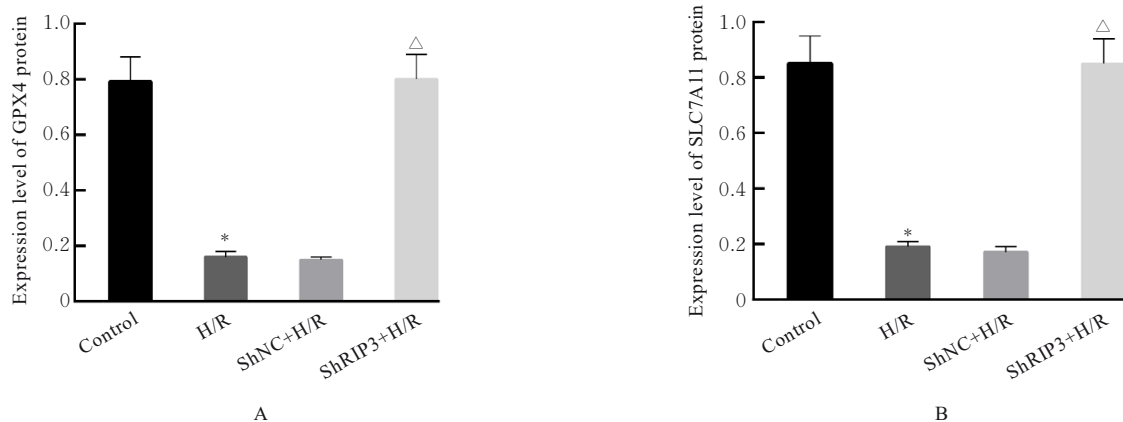
图8 各组HK2细胞中GPX4和SLC7A11蛋白表达电泳图

Fig. 8 Electrophoregram of expressions of GPX4 and SLC7A11 proteins in HK2 cells in various groups

肺^[8]。急性肾损伤的严重程度与多种因素有关, 确切发病机制有待深入研究。RIP3作为程序性坏死的关键调节因子, 可以控制肿瘤坏死因子受体家族的下游信号传导, 并通过与RIP1相互作用导致RIP3-RIP3同源相互作用及RIP3磷酸化, 磷酸化的RIP3募集并激活混合系列蛋白激酶样结构域(mixed lineage kinase domain-like, MLKL), 使MLKL易位至细胞膜诱导坏死性病变^[9]。WANG等^[10]研究发现: RIP3缺乏减轻了氧嗪酸钾诱导的小鼠高尿酸血症, 降低了肾脏促炎细胞因子表达水平, 对肾脏损伤起保护作用。FENG等^[11]研究发现: RIP3易位至线粒体, 促进线粒体降解, 增加肾缺血再灌注后炎症反应和肾组织损伤; WANG等^[12]发现: 急性DeBakey I型主动脉夹层患者血浆RIP3水平与术后急性肾损伤和炎症反应有关, 且患者血浆RIP3水平越高, 患者生存率越低。因此, RIP3在急性肾损伤中发挥了重要作用, 可能是未来治疗

策略的重要靶点。本研究在H/R诱导的HK2细胞中转染慢病毒干扰载体质粒shRIP3, 并成功敲低了RIP3的mRNA和蛋白表达。本研究结果显示: 敲低RIP3表达能够减轻H/R诱导的HK2细胞焦亡和铁死亡, 诱导HK2细胞自噬, 并使细胞存活率升高。

自噬是一种高度保守的过程, 通过溶酶体降解和回收错误折叠蛋白质及衰老细胞器, 以维持细胞稳态^[13]。自噬功能障碍与多种疾病的发病机制有关, 激活自噬对急性肾损伤具有保护作用。恩格列净可通过促进自噬和降低氧化应激、炎症及凋亡改善非糖尿病大鼠的肾缺血再灌注损伤^[14]。缺血预处理通过激活近端肾小管细胞自噬, 进而减少缺血再灌注急性期肾组织中巨噬细胞浸润, 介导肾内膜的保护作用^[15]。LC3B属于哺乳动物细胞中自噬相关蛋白8 (autophagy-related protein, ATG8) 基因的同系物, 定位于自噬囊泡膜表面, 参与自噬体形成。自噬过程涉及LC3-I向LC3-II的转化, LC3-II/LC3-I比值可被视为反映自噬水平的主要指标^[16]。Beclin1是自噬的成熟调节因子, 与Ⅲ类磷脂酰肌醇3激酶复合物相互作用, 产生磷酸化磷脂酰肌醇后, 通过与相关核心成分结合以促进自噬体的形成和成熟^[17]。本研究结果显示: H/R诱导的HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度降低, LC3 II/LC3 I比值降低, Beclin1蛋白表达水平降低, 表明H/R处理抑制了HK2细胞自噬; 敲低RIP3后可升高HK2细胞中LC3B蛋白荧光强度, LC3 II/LC3 I比值升高, Beclin1蛋白表达水平升高, 提示敲低RIP3可诱导H/R诱导的HK2细胞自噬。



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with H/R group.

图9 各组HK2细胞中GPX4(A)和SLC7A11(B)蛋白表达水平

Fig. 9 Expression levels of GPX4(A) and SLC7A11(B) proteins in HK2 cells in various groups

肾脏疾病的发生和发展均与细胞焦亡有关。焦亡导致的细胞死亡与凋亡相似,均以DNA断裂为特征。然而,焦亡是依赖炎症反应的程序性坏死,该过程不由经典的凋亡相关途径所调节^[18]。H/R中产生的大量活性氧加剧了炎症活动,有助于炎症信号因子的形成,包括NLRP3炎性体,其激活可进一步诱发焦亡^[19]。NLRP3炎性小体由NLRP3、Caspase-1前体(pro-Caspase-1)和凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a card, ASC)组成,其催化pro-Caspase-1转化为活化的Caspase-1,从而促进IL-1 β 和IL-18的成熟和分泌,并激活GSDMD产生N末端片段寡聚物,导致细胞膜破裂,诱导焦亡发生^[20]。因此,抑制NLRP3炎性体介导的焦亡是抑制肾缺血/再灌注后肾损伤的重要途径。本研究结果显示:H/R诱导的HK2细胞中NLRP3蛋白荧光强度升高,Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白相对表达量均上调,提示H/R处理促进了HK2细胞焦亡发生;在敲低RIP3后HK2细胞中NLRP3蛋白荧光强度降低,Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18蛋白表达均下调,提示敲低RIP3能够抑制H/R诱导的HK2细胞焦亡。

本研究结果显示:H/R诱导后HK2细胞中Fe²⁺水平升高,铁死亡负调节蛋白GPX4和SLC7A11蛋白表达下调。铁死亡是一种新型细胞死亡调节方式,由铁介导的脂质过氧化积累、质膜破裂和损伤相关分子的释放所诱导。特定小分子化合物作用于细胞各向异性靶标,导致抗氧化剂谷胱甘肽或GPX4表达下调,导致细胞中活性氧积累和脂质过氧化,在Fe²⁺的协同作用下,细胞发生铁死亡^[21]。SLC7A11是胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白的一个亚基,主要功能是跨细胞膜交换胱氨酸和谷氨酸,从而抑制铁死亡^[22]。铁死亡失调已在多种生理和病理过程中得到证实,如癌症、组织损伤和T淋巴细胞免疫等。此外,人尿源性干细胞来源的外泌体携带的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)中磺胺上调基因1(taurine upregulated 1, TUG1)通过抑制酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)介导的铁死亡来缓解缺血再灌注诱导的急性肾损伤^[23]。核苷治疗减轻了叶酸诱导的急性肾损伤小鼠肾组织病变,抑制了炎症细胞浸润并改善了肾功能障碍,这一作用机制

与抑制铁死亡有关,提示铁死亡可能是肾脏损伤治疗的新靶点^[24]。本研究结果显示:敲低HK2细胞中RIP3后,细胞中Fe²⁺水平降低,铁死亡负调节蛋白GPX4与SLC7A11蛋白表达水平升高,提示敲低RIP3能够减轻H/R诱导的HK2细胞铁死亡。

综上所述,靶向敲低RIP3可诱导H/R人肾小管上皮HK2细胞自噬、抑制细胞焦亡和减轻铁死亡,对H/R环境下的HK2细胞发挥保护效果,本研究结果为临床上预防和治疗缺血再灌注诱导的急性肾损伤提供了新的思路。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

何国斌参与数据统计学分析和文章撰写,王焕参与研究设计。

[参考文献]

- [1] CLARE C S. Identifying and managing acute kidney injury[J]. Nurs Stand, 2022, 37(9): 59-66.
- [2] MENON S, SYMONS J M, SELEWSKI D T. Acute kidney injury[J]. Pediatr Rev, 2023, 44(5): 265-279.
- [3] GRANATA S, VOTRICO V, SPADACCINO F, et al. Oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: focus on ferroptosis, mitophagy and new antioxidants[J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 769.
- [4] KARIMI F, MALEKI M, NEMATBAKHS M. View of the renin-angiotensin system in acute kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion injury [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2022, 2022: 9800838.
- [5] SURESHBABU A, PATINO E, MA K C, et al. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction[J]. JCI Insight, 2018, 3(11): e98411.
- [6] LI R Z, ZHAO X C, ZHANG S, et al. RIP3 impedes transcription factor EB to suppress autophagic degradation in septic acute kidney injury [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6): 593.
- [7] 郭 玥, 周宝娟, 路建饶, 等. 黄连素抗缺氧复氧诱导的人肾小管上皮HK-2细胞凋亡的机制[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(12): 1037-1041.
- [8] SPRANGERS B, LEAF D E, PORTA C, et al. Diagnosis and management of immune checkpoint inhibitor-associated acute kidney injury [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(12): 794-805.
- [9] CHEN X, ZHU R F, ZHONG J J, et al. Mosaic

- composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(4): 471-482.
- [10] WANG K, HU L, CHEN J K. RIP3-deficiency attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 617-626.
- [11] FENG Y S, IMAM ALIAGAN A, TOMBO N, et al. RIP3 translocation into mitochondria promotes mitofilin degradation to increase inflammation and kidney injury after renal ischemia-reperfusion[J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1894.
- [12] WANG L, ZHONG G D, ZHOU H, et al. Plasma levels of receptor-interacting protein kinase 3 is associated with postoperative acute kidney injury in acute DeBakey type I aortic dissection [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2022, 17(1): 35.
- [13] XIANG Y, FU Y, WU W W, et al. Autophagy in acute kidney injury and maladaptive kidney repair [J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkac059.
- [14] ALA M, KHOSHDEL M R F, DEHPOUR A R. Empagliflozin enhances autophagy, mitochondrial biogenesis, and antioxidant defense and ameliorates renal ischemia/reperfusion in nondiabetic rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1197061.
- [15] ZHANG S, XIA W M, DUAN H Q, et al. Ischemic preconditioning alleviates mouse renal ischemia/reperfusion injury by enhancing autophagy activity of proximal tubular cells[J]. *Kidney Dis*, 2022, 8(3): 217-230.
- [16] HWANG H J, KIM Y K. The role of LC3B in autophagy as an RNA-binding protein [J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 1028-1030.
- [17] TRAN S, FAIRLIE W D, LEE E F. BECLIN1: protein structure, function and regulation[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1522.
- [18] 张慧欣, 辜银萍, 胡宇声, 等. NLRP3炎性小体和细胞焦亡在消化系统疾病中的作用机制[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(1): 96-101.
- [19] ZHENG Y, XU X D, CHI F L, et al. Pyroptosis: a newly discovered therapeutic target for ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1625.
- [20] COLL R C, SCHRODER K, PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [21] HOSOHATA K, HARNSIRIKARN T, CHOKESUWATTANASKUL S. Ferroptosis: a potential therapeutic target in acute kidney injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6583.
- [22] FIORE A, ZEITLER L, RUSSIER M, et al. Kynurenine importation by SLC7A11 propagates anti-ferroptotic signaling[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(5): 920-932.
- [23] SUN Z J, WU J Y, BI Q, et al. Exosomal lncRNA TUG1 derived from human urine-derived stem cells attenuates renal ischemia/reperfusion injury by interacting with SRSF1 to regulate ASCL4-mediated ferroptosis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 297.
- [24] LI D Y, LIU B, FAN Y M, et al. Nuciferine protects against folic acid-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(5): 1182-1199.