

· 基础研究 ·

Caspase 依赖的氧化应激对脓毒症肾小管上皮细胞损伤的作用及机制

孙林春¹, 刘建琛^{2,3}, 张 利^{2,4*}

¹南京医科大学附属儿童医院儿科研究所, 江苏 南京 210008; ²江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210009; ³南京中医药大学附属中西医结合医院肾内科, ⁴检验科, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的: 观察不同活性氧(reactive oxygen species, ROS)及氧化应激水平对脓毒症肾小管上皮细胞增殖、凋亡、周期等生物学效应的影响, 探索氧化应激水平和线粒体-Caspase 途径能否作为脓毒症肾小管上皮损伤的治疗靶点。方法: 用终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理人肾小管上皮 HK-2 细胞 12 h 建立脓毒症细胞模型, 将细胞模型随机分为 H_2O_2 组(H_2O_2 , 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Caspase 抑制剂组(Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Caspase 抑制剂+ H_2O_2 组(H_2O_2 , 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ +Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$)和阴性对照组(不处理); 另以正常培养的 HK-2 细胞为空白对照组。Western blot 检测 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-多聚 ADP 核糖多聚酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)蛋白表达, MTT 检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞 ROS 水平、细胞凋亡和细胞周期。结果: 阴性对照组细胞 ROS 水平、凋亡率、凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 水平以及 G1 期细胞比例均较空白对照组升高(P 均 < 0.05), 增殖率较空白对照组降低($P < 0.05$)。 H_2O_2 组细胞 ROS 水平、凋亡率、Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 水平以及 G1 期细胞比例均较阴性对照组升高(P 均 < 0.05), 而增殖率较阴性对照组降低($P < 0.05$)。Caspase 抑制剂+ H_2O_2 组细胞 ROS 水平、凋亡率、Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 水平以及 G1 期细胞比例均较 H_2O_2 组降低(P 均 < 0.05), 但仍高于阴性对照组(P 均 < 0.05); 增殖率较 H_2O_2 组升高($P < 0.05$), 但仍低于阴性对照组($P < 0.05$)。结论: 脓毒症细胞模型中存在异常升高的氧化应激反应。ROS 能通过线粒体-Caspase 凋亡途径抑制脓毒症肾小管上皮细胞增殖, 促进细胞凋亡和引起细胞周期 G1 期阻滞。抑制 Caspase 对 ROS 引起的脓毒症肾小管上皮细胞损伤有一定保护作用。

[关键词] 脓毒症; 肾损伤; 氧化应激; 线粒体; 凋亡

[中图分类号] R631

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)01-023-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20220104

The mechanism of Caspase-dependent oxidative stress on sepsis renal tubular epithelial cell injury

SUN Linchun¹, LIU Jianjing^{2,3}, ZHANG Li^{2,4*}

¹Pediatric Research Center, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008; ²Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009; ³Nephrology Department, ⁴Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of different levels of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress on cell proliferation, apoptosis, cycle in the renal tubular epithelial model of sepsis, and to explore whether oxidative stress and mitochondrial-Caspase pathway can be used as the therapeutic target of sepsis renal tubular epithelial injury. **Methods:** Human renal tubular epithelial HK-2 cells were treated with lipopolysaccharide(LPS) at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 h to establish a sepsis cell model. The sepsis cell model was randomly divided into H_2O_2 group (H_2O_2 , 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$), Caspase inhibitor group (Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$), Caspase inhibitor+ H_2O_2 group (H_2O_2 , 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ +Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$) and negative control group(no treatment). Normal cultured HK-2 cells were taken as the blank control group. the expression of Cleaved-Caspase-3 and Cleaved-poly ADP-ribose

[基金项目] 南京市卫生科技发展专项(YKK20125)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 4824122@qq.com

polymerase (PARP) protein were detected by Western blot, cell proliferation was detected by MTT, cell ROS levels, apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometr. **Results:** The ROS, apoptosis rate, Cleaved-Caspase 3 and Cleaved-PARP level, the proportion of G1 cells in negative control group were all higher than those in blank control group (all $P < 0.05$), the proliferation rate was lower than that of blank control group ($P < 0.05$). The ROS, apoptosis rate, Cleaved-Caspase 3 and Cleaved-PARP level, the proportion of G1 cells in H_2O_2 group were all higher than those of negative control group (all $P < 0.05$), the proliferation rate was lower than that of negative control group ($P < 0.05$). The ROS, apoptosis rate, Cleaved-Caspase 3 and Cleaved-PARP levels, the proportion of G1 cells in Caspase inhibitor+ H_2O_2 group were all lower than those of H_2O_2 group (all $P < 0.05$), but were all higher than negative control group ($P < 0.05$), the proliferation rate was higher than that of H_2O_2 group ($P < 0.05$), but still lower than that of negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The oxidative stress level of sepsis cell model is abnormally upregulated. Excessive ROS can inhibit the proliferation of septic renal tubular epithelial cells, promote cell apoptosis and cause cell cycle G1 block through the mitochondrial-Caspase pathway. Inhibition of Caspase has a certain protective effect on renal tubular epithelial cell injury in sepsis caused by ROS.

[Key words] sepsis; kidney injury; oxidative stress; mitochondria; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(01):023-029, 070]

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是致病因素引起的短时间内肾脏功能急剧下降和/或肾实质损伤,在临床极为常见,在住院患者中的发生率为2%~12%,重症监护室患者可高达30%^[1]。AKI增加了肾脏病患者进展到终末期的风险,导致预后不良,尤其是同时发生肾功能下降和肾实质损伤的患者^[2]。引起AKI的病因很多,如缺血-再灌注损伤、烧伤、药物毒性、脓毒症等,其中脓毒症所致AKI占临床AKI的比例不断增加,占到AKI病因的29.6%~47.6%^[3]。AKI又能加重其他脏器损伤,引起多器官功能障碍。与非脓毒症性AKI和单纯脓毒症患者相比,合并AKI的脓毒血症患者预后明显变差,病死率在50%~80%^[4]。如何防治AKI已经成为全球性的公共卫生问题,是肾脏病学及重症医学面临的重要挑战。

氧化应激是脓毒症肾损伤的重要机制之一。线粒体是肾小管细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源。脓毒症时,肾组织受全身炎症反应的影响,ROS生成增多,最终引起脓毒症肾损伤^[5]。调节ROS和氧化应激状态可能成为脓毒症肾损伤的潜在治疗靶点。线粒体途径是经典的细胞凋亡信号通路。近来研究发现,ROS爆发涉及线粒体途径的细胞凋亡^[6]。肿瘤细胞局部高浓度ROS能引起线粒体膜通透性转运孔开放,跨膜电位降低,细胞色素释放并激活半胱氨酸蛋白酶Caspase,通过下游级联反应导致DNA碱基断裂,诱导凋亡^[7]。但脓毒症肾细胞损伤中氧化应激和Caspase途径细胞凋亡的研究还较少。

模式识别分子通过模式识别受体作用于肾小

管上皮细胞,诱导炎症反应和组织细胞损伤。脓毒症时,病原体相关分子模式被体内的模式识别受体识别,引发炎症反应;革兰阴性细菌外膜的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是目前脓毒症中研究最多的外源性模式识别分子^[8]。 H_2O_2 能在短时间内提高细胞中氧化应激水平,且涉及多种信号通路,被广泛用于体外诱导氧化应激损伤的细胞模型^[9]。本研究通过LPS刺激建立人肾小管上皮细胞HK-2的脓毒症细胞模型,用 H_2O_2 和Caspase 3特异性肽类抑制剂Ac-DEVD-CHO单独或联合干预细胞,观察Caspase依赖的氧化应激对肾小管上皮细胞损伤的调节作用,探讨脓毒症肾小管上皮损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾小管上皮细胞HK-2细胞购自中科院典型培养物保藏中心,用含10%胎牛血清、100 U/mL青链霉素双抗的DMEM/F12培养基,在37℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。

兔抗人Cleaved-Caspase 3多克隆抗体、兔抗人Cleaved-PARP多克隆抗体和兔抗人 β -actin多克隆抗体(ABI公司,美国);酶标羊抗兔IgG(南京建成生物工程研究所); H_2O_2 、Caspase 3抑制剂Ac-DEVD-CHO(上海碧云天生物技术研究所);MTT试剂盒(上海生工生物工程有限公司);Annexin V/PI凋亡检测试剂盒(BD公司,美国);DHE试剂盒(Invitrogen公司,美国)。凝胶成像系统(Bio-Rad公司,美国),流式细胞仪(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 脓毒症细胞模型分组

用终浓度 10 μg/mL 的 LPS 处理 12 h 建立脓毒症细胞模型,分为:阴性对照组(不做处理)、过氧化氢组(H₂O₂ 300 μmol/L)、Caspase 抑制剂组(Ac-DEVD-CHO 15 μmol/L)、Caspase 抑制剂+过氧化氢组(H₂O₂ 300 μmol/L+Ac-DEVD-CHO 15 μmol/L),并以正常培养的 HK-2 细胞为空白对照组。

1.2.2 Western blot 检测

提取细胞总蛋白,用蛋白标准品绘制标准曲线进行蛋白定量。80 V 恒压电泳 30 min 后,继续用 120 V 恒压电泳至蛋白 Marker 跑至距离胶底 1 cm,停止电泳。用硝酸纤维素薄膜 90 V 恒压下电转 2 h。将蛋白膜用封闭液(含 5% 脱脂奶粉)室温封闭 2 h,再浸入用封闭液按 1:500 稀释的一抗溶液中,4 °C 过夜;将蛋白膜用 TBST 洗涤 3 次,5 min/次后,再浸入用 TBST 按 1:1 000 稀释的二抗溶液中,室温孵育 1 h。洗膜后,用显影剂显色,用自动凝胶成像系统记录并分析 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 蛋白条带。

1.2.3 ROS 检测

将各组细胞制成 1×10⁵ 个/mL 单细胞悬液,按 100 μL/孔加入流式管中,加入 5 μmol/L DHE,37 °C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤后,上流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞增殖检测

将细胞按 1×10³ 个/孔接种到 96 孔板,给予相应处理,每组设 6 个平行孔。分别在处理后的 0 h 和 48 h,每孔加入 20 μL MTT 溶液,置培养箱中孵育 4 h。用酶标仪检测各孔在 490 nm 处的吸光度,计算细胞存活率,以时间为横坐标,存活率为纵坐标,绘制细胞增殖曲线。

1.2.5 细胞凋亡检测

将各组细胞用胰酶消化后,用 PBS 缓冲液制成 1×10⁵ 个/mL 单细胞悬液,按 100 μL/孔加入流式管中,再分别加入 20 μL Annexin V-异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC),和 20 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)。另设单阳管和阴性对照管,室温避光孵育 20 min;再加入 500 μL PBS 缓冲液,混匀后上流式细胞仪检测。

1.2.6 细胞周期检测

将各组细胞制成 1×10⁵ 个/mL 单细胞悬液,按 100 μL/孔加入流式管中,加入 1 mL PBS 和 2 mL 无水乙醇,用封口膜密封管口置于 4 °C 24 h,固定细胞。吸出上清液,加 3 mL PBS 重悬细胞,离心,向管

底加入 200 μL 50 mg/mL 的 PI 染液,4 °C 避光孵育 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期。

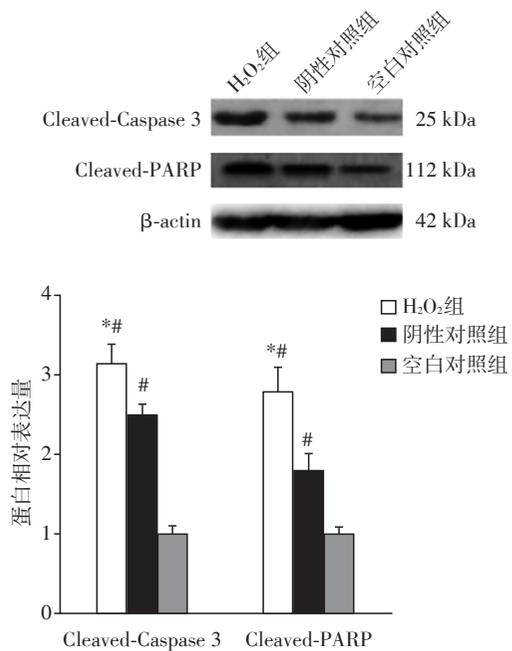
1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件进行数据处理,结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 引起脓毒症肾小管上皮细胞凋亡相关蛋白的异常表达

H₂O₂ 组肾小管上皮细胞 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 蛋白表达较阴性对照组显著升高(*P* < 0.05);两组 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 蛋白均高于空白对照组(*P* < 0.05,图 1)。结果表明,H₂O₂ 能引起脓毒症肾小管上皮细胞凋亡相关蛋白异常表达。



与阴性对照组相比,**P* < 0.05;与空白对照组相比,**P* < 0.05(*n*=5)。

图1 各组凋亡相关蛋白的表达

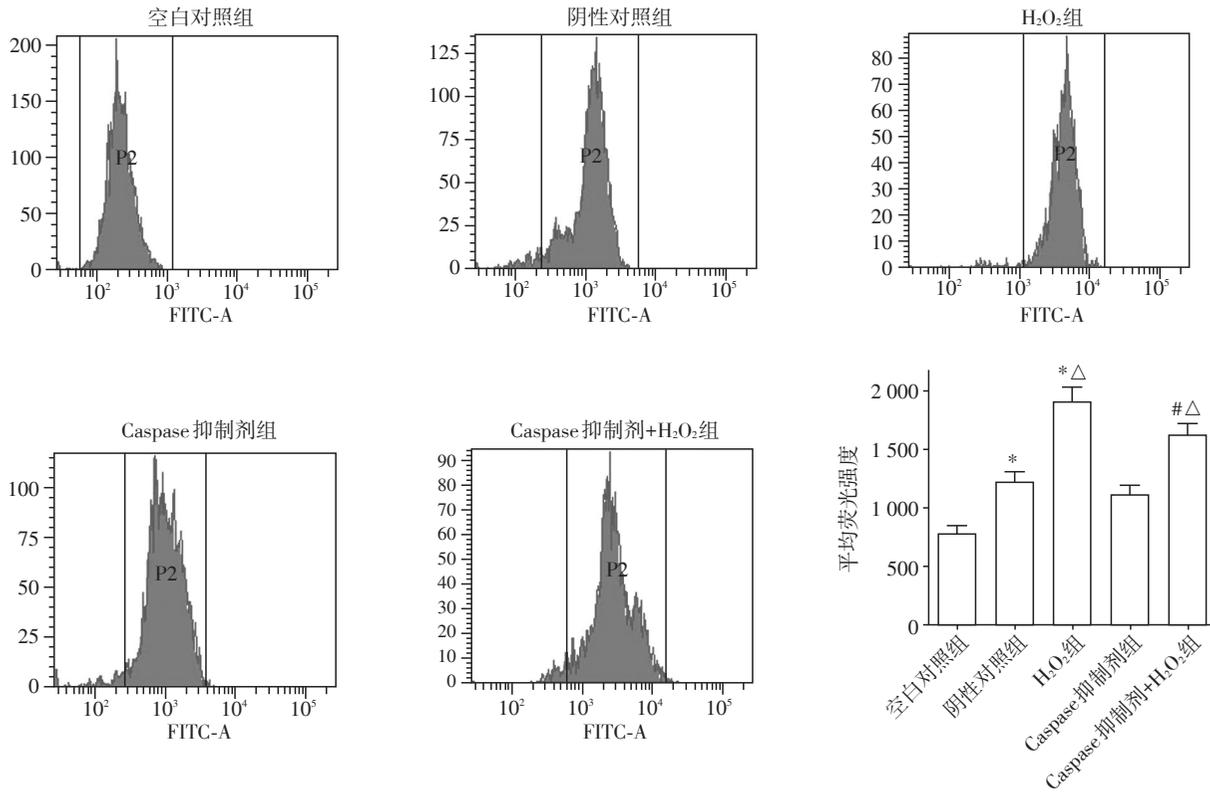
Figure 1 Expression of apoptosis-related proteins in each group

2.2 Caspase 抑制剂降低氧化应激诱导的脓毒症肾小管上皮细胞 ROS 水平

空白对照组、阴性对照组、H₂O₂ 组、Caspase 抑制剂组和 Caspase 抑制剂+ H₂O₂ 组细胞中 ROS 平均荧光强度分别为 783±67、1 216±92、1 915±122、

1 112±85 和 1 623±100。阴性对照组中 ROS 水平较空白对照组细胞升高 ($P < 0.05$); H₂O₂ 组 ROS 水平较阴性对照组进一步升高 ($P < 0.05$), Caspase 抑制剂+H₂O₂ 组细胞中 ROS 水平较 H₂O₂ 组降低

($P < 0.05$), 但仍高于阴性对照组 ($P < 0.05$, 图 2)。结果说明, H₂O₂ 能提高脓毒症肾小管上皮细胞的 ROS 水平, 而 Caspase 抑制剂能降低 H₂O₂ 诱导的 ROS 水平升高效应。



与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 H₂O₂ 组相比, # $P < 0.05$ (n=5)。

图2 各组细胞 ROS 水平检测

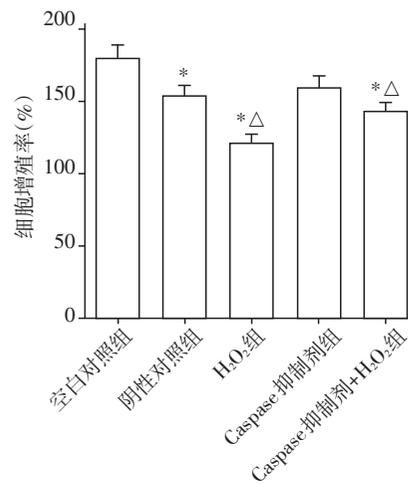
Figure 2 Detection of ROS levels in each group

2.3 Caspase 抑制剂削弱氧化应激对脓毒症肾小管上皮细胞增殖的抑制作用

空白对照组、阴性对照组、H₂O₂ 组、Caspase 抑制剂组和 Caspase 抑制剂+ H₂O₂ 组细胞增殖率分别为 (179.21±9.00)%、(153.57±7.40)%、(120.20±6.24)%、(159.21±8.25)% 和 (143.21±5.33)%。阴性对照组细胞增殖率低于空白对照组 ($P < 0.05$), H₂O₂ 组细胞增殖率低于阴性对照组 ($P < 0.05$), 说明 H₂O₂ 诱导的氧化应激能抑制脓毒症肾小管上皮细胞增殖。Caspase 抑制剂+ H₂O₂ 组细胞增殖率较 H₂O₂ 组升高 ($P < 0.05$), 但仍低于阴性对照组 ($P < 0.05$, 图 3), 说明 Caspase 抑制剂能部分逆转氧化应激对细胞增殖的抑制效应。

2.4 Caspase 抑制剂抑制氧化应激诱导的脓毒症肾小管上皮细胞凋亡

由图 4 可见, 空白对照组、阴性对照组、H₂O₂ 组、



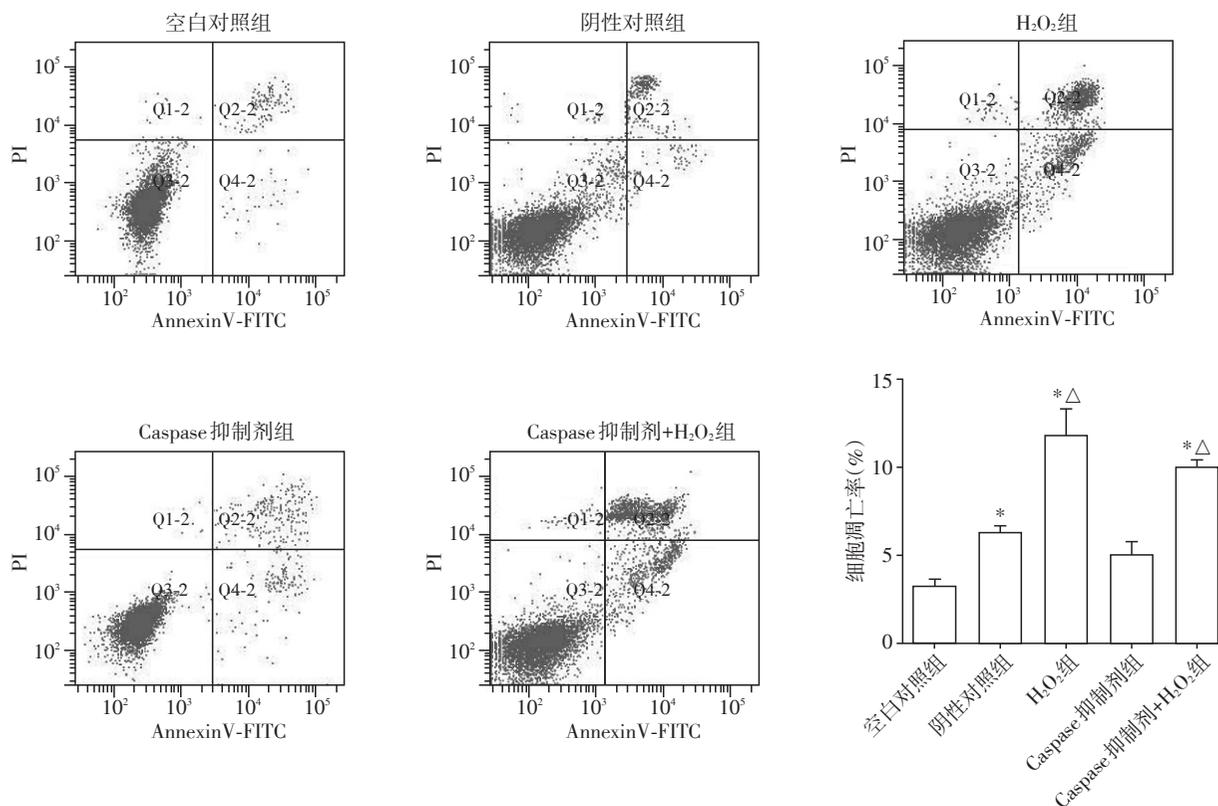
与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 H₂O₂ 组相比, # $P < 0.05$ (n=6)。

图3 各组细胞增殖水平检测

Figure 3 Detection of cell proliferation in each group

Caspase 抑制剂组和 Caspase 抑制剂+H₂O₂组的细胞凋亡率分别为 (3.18 ± 0.43)%、(6.25 ± 0.40)%、(11.75 ± 1.61)%、(5.01 ± 0.78)%和(9.97 ± 0.47)%。阴性对照组细胞凋亡率较空白对照组升高 ($P < 0.05$), H₂O₂组细胞凋亡率较阴性对照组升高 ($P < 0.05$)。Caspase 抑制剂+H₂O₂组细胞凋亡率较 H₂O₂组降低 ($P < 0.05$), 仍高于阴性对照组 ($P < 0.05$)。

H₂O₂组细胞中 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-PARP 蛋白表达较阴性对照组升高 ($P < 0.05$), Caspase 抑制剂 + H₂O₂组细胞中 Cleaved - Caspase 3 和 Cleaved-PARP 蛋白表达较 H₂O₂组降低 ($P < 0.05$, 图 5)。结果显示, H₂O₂能诱导脓毒症肾小管上皮细胞凋亡, 而 Caspase 抑制剂能抑制 H₂O₂诱导的细胞凋亡。



与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, ^ $P < 0.05$; 与 H₂O₂组相比, # $P < 0.05$ ($n=5$)。

图 4 各组细胞凋亡检测

Figure 4 Detection of cell apoptosis in each group

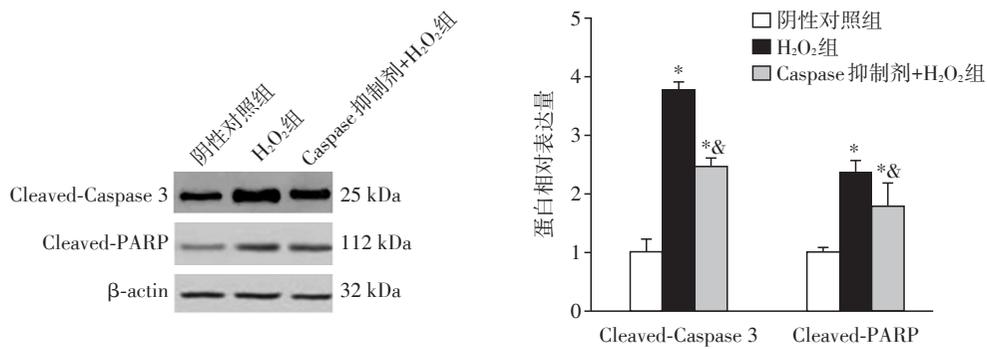
2.5 Caspase 抑制剂削弱氧化应激对脓毒症肾小管上皮细胞周期的阻滞

由图 6 可见, 空白对照组处于 G1 期、G2 期和 S 期的细胞分别占 (21.50 ± 2.10)%、(32.63 ± 2.76)% 和 (45.87 ± 4.59)%。阴性对照组处于 G1 期、G2 期和 S 期的细胞分别占 (26.50 ± 2.01)%、(27.63 ± 3.34)% 和 (45.87 ± 4.23)%。H₂O₂组处于 G1 期、G2 期和 S 期的细胞分别占 (37.23 ± 3.67)%、(15.39 ± 2.10)% 和 (47.38 ± 5.32)%。Caspase 抑制剂组处于 G1 期、G2 期和 S 期的细胞分别占 (28.67 ± 3.87)%、(27.12 ± 2.98)% 和 (44.20 ± 5.10)%。Caspase 抑制剂+H₂O₂组处于 G1 期、G2 期和 S 期的细胞分别占 (30.22 ± 3.45)%、(21.01 ± 3.44)% 和 (48.77 ± 3.78)%。各组 S

期细胞比例无显著差异 ($P > 0.05$)。阴性对照组 G1 期细胞比例高于空白对照组 ($P < 0.05$), H₂O₂组细胞 G1 期比例高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 说明 H₂O₂诱导的氧化应激能引起脓毒症细胞周期紊乱, 发生 G1 期阻滞。Caspase 抑制剂+H₂O₂组细胞 G1 期比例低于 H₂O₂组 ($P < 0.05$), 说明 Caspase 抑制剂能逆转 H₂O₂对细胞周期 G1 期的阻滞作用, 促进周期进展。

3 讨论

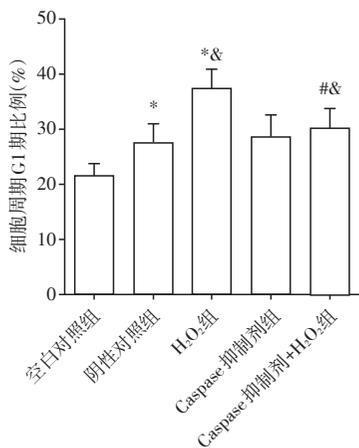
脓毒症是宿主在应对感染时反应失调而引起的一种器官功能障碍综合征, 临床上 50% 的脓症患者均有不同程度的肾损害, 并且与脓毒症的 2 年死亡率密切相关^[10,11]。大多数脓症患者死于多器



与阴性对照组相比,* $P < 0.05$;与H₂O₂组相比,# $P < 0.05$ ($n=5$)。

图5 各组凋亡相关蛋白的表达

Figure 5 Expression of apoptosis-related proteins in each group of sepsis



与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与阴性对照组相比,# $P < 0.05$;与H₂O₂组相比,* $P < 0.05$ ($n=5$)。

图6 各组细胞G1期比例

Figure 6 Proportion of G1 phase cells in each group

官衰竭,AKI是最常见的并发症之一,是脓毒症患者死亡的独立危险因素^[2],寻找脓毒症急性肾损伤的特异性标志物和有效的防治策略刻不容缓。

氧化应激损伤是脓毒症组织器官损伤的重要机制,且氧化应激和脓毒症全身和局部持续性炎症反应之间存在密切关联。病原体及其释放的毒素激活炎症反应及宿主释放炎症介质会影响氧化呼吸链的偶联过程,引起线粒体损伤和功能障碍,最终导致组织、器官损伤。脓毒症大鼠肺组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性降低,诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性升高^[12]。产生的大量iNOS源性一氧化氮对心肌细胞也有毒性作用,能抑制心肌产生ATP,引起心肌收缩障碍,最终导致脓毒症心力衰竭^[13]。氧化应激也会对肾组织造成损伤,线粒体是肾实质细胞ROS的主要产生部位^[14]。生理条件下,肾实质

细胞中的ROS维持在较低水平,对肾小管和肾微循环的生理调节有作用^[15];脓毒症时,在各种炎症因子的刺激下,肾小管和肾血管中ROS生成增强,同时谷胱甘肽(glutathione, GSH)等抗氧化物减少,ROS攻击肾小管细胞导致膜损伤及线粒体超氧阴离子渗漏,随着细胞中ROS浓度的进一步增加,最终引起脓毒症肾损伤^[16]。以氧化应激损伤为靶点的治疗已经成为近年来脓毒症的研究热点。本研究发现,用LPS刺激肾小管上皮细胞后,细胞ROS水平明显较正常肾小管上皮细胞升高,提示脓毒症时肾小管细胞的氧化应激水平较生理状态异常升高。本研究用H₂O₂处理细胞,ROS检测显示H₂O₂引起了细胞更高水平的氧化应激损伤,结果显示,与未经H₂O₂处理的脓毒症细胞模型相比,H₂O₂组细胞的增殖率降低,凋亡率升高,同时发生了细胞周期的G1期阻滞。结合文献报告和本研究结果,我们更倾向于认为ROS对脓毒症肾小管上皮细胞有抑制增殖和周期进展,诱导凋亡的作用,这与文献中以缓解氧化应激作为脓毒症肾损伤治疗的理论依据相吻合。

Caspase是一类半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,存在于胞质中,线粒体途径细胞凋亡的本质是Caspase依赖的蛋白酶级联反应^[17]。本研究重点关注的正是ROS与线粒体途径的细胞凋亡。有研究发现,肿瘤细胞高表达Caspase-3/7,能破坏线粒体膜电位和上调ROS水平,诱导细胞凋亡,ROS抑制剂能逆转这种效应^[18]。原代大鼠软骨细胞中过高水平的ROS能引起细胞色素c和Caspase-3高表达,促进细胞凋亡^[19]。本研究用Caspase抑制剂Ac-DEVD-CHO联合H₂O₂处理脓毒症肾小管上皮细胞模型,结果发现,细胞ROS水平较H₂O₂组降低,但仍

高于阴性对照组,说明H₂O₂诱导的氧化应激在一定程度上具有Caspase依赖性,抑制Caspase能部分减弱脓毒症肾小管上皮的氧化应激损伤。细胞的相关生物学行为检测显示,Caspase抑制剂联合H₂O₂处理的脓毒症肾小管上皮细胞增殖率较H₂O₂组升高,凋亡率降低,细胞周期处于G1期的比例减少,说明氧化应激损伤对脓毒症肾小管细胞增殖、凋亡和细胞周期的作用具有Caspase依赖性,抑制Caspase能逆转氧化应激损伤对脓毒症肾小管细胞的抑制增殖、促进凋亡和引起细胞周期G1期阻滞的效应。但是,Caspase抑制剂联合H₂O₂处理组的细胞增殖、凋亡和G1期细胞周期所占比例仍和阴性对照组有差异,说明抑制Caspase只能部分影响氧化应激对脓毒症肾小管上皮的作用,提示氧化应激可能还通过其他途径对脓毒症肾小管上皮细胞造成损伤。Kaleem等^[20]研究显示Caspase释放的功能受O²⁻调节,这与本研究结果相吻合。

综合以上实验结果,认为ROS造成的脓毒症肾小管上皮细胞增殖抑制、凋亡增加和细胞周期G1期阻滞效应,部分是通过线粒体-Caspase途径实现的。通过直接降低ROS水平或阻断线粒体-Caspase凋亡途径,都能对脓毒症时肾小管上皮细胞中异常升高的氧化应激水平产生抑制作用,并通过促进细胞的增殖和周期进展,减少细胞凋亡坏死,对肾小管上皮损伤起保护作用。但是除了线粒体-Caspase途径,其他细胞凋亡通路是否也在脓毒症肾小管损伤中发挥作用,目前尚不清楚,未来还需要更多的实验进行探讨。

[参考文献]

- [1] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3): 304-377
- [2] FANI F, REGOLISTI G, DELSANTE M, et al. Recent advances in the pathogenetic mechanisms of sepsis-associated acute kidney injury[J]. J Nephrol, 2018, 31(3): 351-359
- [3] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810
- [4] PEERAPORNTRATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1083-1099
- [5] PRAUCHNER C A. Oxidative stress in sepsis: pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy[J]. Burns, 2017, 43(3): 471-485
- [6] REDZA-DUTORDOIR M, AVERILL-BATES D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(12): 2977-2992
- [7] POUPEL F, AGHAEI M, MOVAHEDIAN A, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human bladder cancer cell lines through reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and cytochrome C pathway[J]. Int J Prev Med, 2017, 8: 78
- [8] 李冲, 陈涛, 陈森. TLR4/TRIF/Caspase-8信号通路对脓毒症树突状细胞凋亡的关系研究进展[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(22): 3411-3413
- [9] 翟学花, 蒋政宇, 薄禄龙, 等. 白细胞介素-1受体相关激酶M抑制p22phox调控脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞呼吸爆发[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2019, 40(5): 420-425
- [10] MAYEUX P R, MACMILLAN-CROW L A. Pharmacological targets in the renal peritubular microenvironment: implications for therapy for sepsis-induced acute kidney injury[J]. Pharmacol Ther, 2012, 134(2): 139-155
- [11] HONORE P M, JACOBS R, HENDRICKX I, et al. Prevention and treatment of sepsis-induced acute kidney injury: an update[J]. Ann Intensive Care, 2015, 5(1): 51
- [12] EMEL A, HILAL Y. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of curcumin on lung tissue in rats with sepsis[J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40(5): 820-826
- [13] GAO S, LI H, XIE H, et al. Therapeutic efficacy of Schistosoma japonicum cystatin on sepsis-induced cardiomyopathy in a mouse model[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 260
- [14] 杨玲云, 郭燕, 倪佳佳, 等. miR-30e在顺铂诱导的肾近端小管上皮细胞凋亡和线粒体损伤中的作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(8): 1060-1065
- [15] 曾小娜, 尹连红, 许丽娜. 脓毒症急性肾损伤发病机制[J]. 生理科学进展, 2020, 51(2): 122-126
- [16] 唐亚纯, 许武军, 陈仙, 等. H₂S通过调控iNOS/HO-1/Bax/Caspase3轴对尿源性脓毒症所致急性肾损伤的保护作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(20): 2433-2437, 2445
- [17] 张恒璐, 陈天宇, 王苏雨, 等. 过表达羧肽酶E对高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞增殖和凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2020, 40(3): 374-379, 384
- [18] HUANG T C, LEE J F, CHEN J Y. Pardaxin, an anti-

[28] JOHNSON E A, DAO T L, GUIGNET M A, et al. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1 α by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8:41

[29] LIU C, CUI G, ZHU M, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12):8342-8355

[30] MARCINIAK E, FAIVRE E, DUTAR P, et al. The Chemokine MIP-1 α /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15862

[31] BARTFAI T, SANCHEZ-ALAVEZ M, ANDELL-JONSSON S, et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1113:173-177

[32] GAO Q, WANG S, CHEN X, et al. Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8⁺ T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1):42

[33] NAKAJIMA C, MUKAI T, YAMAGUCHI N, et al. Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN- γ stimulation[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(6):1792-1801

[34] MCCOLL S R, MAHALINGAM S, STAYKOVA M, et al. Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(11):1418-1429

[35] COLE K E, STRICK C A, PARADIS T J, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(12):2009-2021

[36] HOKENESS K L, DEWEERD E S, MUNKS M W, et al. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine Cytomegalovirus infection[J]. *J Virol*, 2007, 81(3):1241-1250

[37] 王静茹, 朱晓波, 马宇, 等. 癫痫幼鼠海马丝裂酶原蛋白活化激酶表达的特点及其对巨噬细胞炎性蛋白- α /趋化因子受体5表达的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2017, 30(2):124-129

[38] ROHLWINK U K, MAUFF K, WILKINSON K A, et al. Biomarkers of cerebral injury and inflammation in pediatric tuberculous meningitis[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(8):1298-1307

[39] LIU K, XIAO C, WANG F, et al. Chemokine receptor antagonist block inflammation and therapy Japanese encephalitis virus infection in mouse model[J]. *Cytokine*, 2018, 110:70-77

[收稿日期] 2021-05-14

(本文编辑:蒋莉)

(上接第29页)

crobal peptide, triggers caspase-dependent and ROS-mediated apoptosis in HT-1080 cells[J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(10):1995-2009

[19] JIANG L, LI L, GENG C, et al. Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes *in vitro*[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(3):364-369

[20] KALEEM S, SIDDIQUI S, SIDDIQUI H H, et al. Eupalitin induces apoptosis in prostate carcinoma cells through ROS generation and increase of caspase-3 activity[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(2):196-203

[收稿日期] 2021-02-10

(本文编辑:蒋莉)