

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.06.006

中性粒细胞胞外诱捕网通过调节细胞焦亡 对肾缺血再灌注损伤的影响*

张秋雯^{1,2}, 朱丽容¹, 虞燕青¹, 陆 兵^{2,3,4}, 李海滨^{2,3,4}, 孙煦勇^{2,3,4△}

1. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学第二附属医院
移植医学研究所, 广西南宁 530007; 3. 广西器官移植临床医学研究中心, 广西南宁 530007;
4. 广西器官捐献与移植研究重点实验室, 广西南宁 530007

摘 要:目的 探讨中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)在肾缺血再灌注损伤中的作用,以及 NETs 与细胞焦亡之间的关系。方法 将 30 只 C57 小鼠随机分为肾缺血再灌注损伤组(IRI 组)、假手术组(Sham 组)和脱氧核糖核酸酶 I 组(DNase I 组),每组 10 只。使用无创血管夹夹闭双侧肾蒂 45 min、再灌注 24 h 的方法构建小鼠肾缺血再灌注模型;DNase I 组小鼠术前 1 h 腹腔注射 DNase I 2.5 mg/kg。采用 HE 染色法评估各组小鼠肾脏损伤情况。检测各组小鼠外周血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平。采用免疫荧光双染检测各组肾组织中 NETs 标志物中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)与淋巴细胞抗原 6G(LY6G)蛋白情况。采用蛋白质印迹法测定各组肾组织中瓜氨酸化组蛋白(Cit-H3)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、gasdermin D (GSDMD)、GSDMD-N 端片段(N-GSDMD)水平。使用实时荧光定量反转录 PCR 检测肾组织中 NLRP3、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)信使 RNA(mRNA)水平。使用末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色法检测细胞焦亡情况。结果 Sham 组小鼠肾脏组织结构清晰,肾小球结构完整;IRI 组部分肾小管上皮细胞空泡变性、胞质粉染,肾组织内 MPO 与 LY6G 免疫荧光强度表达增加;DNase I 组肾小管上皮细胞空泡变性改善、胞核脱落减轻,肾组织内 MPO 与 LY6G 免疫荧光强度表达减弱。IRI 组血清 Scr、BUN 水平[(292.400 $\pm$ 20.340) μ mol/L、(135.900 $\pm$ 9.980)mmol/L]及肾组织中 Cit-H3、NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白水平(1.100 $\pm$ 0.107、3.001 $\pm$ 0.092、1.120 $\pm$ 0.089、1.194 $\pm$ 0.122)高于 Sham 组[(25.880 $\pm$ 7.144) μ mol/L、(24.790 $\pm$ 5.063)mmol/L、0.302 $\pm$ 0.039、0.512 $\pm$ 0.108、0.538 $\pm$ 0.042、0.735 $\pm$ 0.060],肾脏细胞焦亡指数[(71.920 $\pm$ 12.890)%]高于 Sham 组[(1.000 $\pm$ 0.433)%],肾组织中 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平(2.841 $\pm$ 0.925、1.725 $\pm$ 0.164、2.081 $\pm$ 0.394)高于 Sham 组(1.035 $\pm$ 0.057、1.008 $\pm$ 0.008、1.007 $\pm$ 0.011),差异均有统计学意义($P<0.05$)。DNase I 组血清 Scr 与 BUN 水平[(31.160 $\pm$ 3.607) μ mol/L、(22.310 $\pm$ 1.897)mmol/L]及肾组织中 Cit-H3、NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白表达水平(0.612 $\pm$ 0.107、0.817 $\pm$ 0.143、0.466 $\pm$ 0.077、0.673 $\pm$ 0.050)低于 IRI 组,肾脏细胞焦亡指数[(1.786 $\pm$ 0.345)%]低于 IRI 组,肾组织中 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平(1.162 $\pm$ 0.256、0.998 $\pm$ 0.093、1.031 $\pm$ 0.157)低于 IRI 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 缺血再灌注损伤可导致 NETs 表达上调并促进细胞焦亡,抑制 NETs 后,可减轻缺血再灌注损伤诱导的肾损伤以及细胞焦亡。NETs 可能是通过促进细胞焦亡加重肾缺血再灌注损伤。

关键词:肾缺血再灌注损伤; 中性粒细胞胞外诱捕网; 细胞焦亡; 炎症反应; 信使 RNA; 蛋白
中图法分类号:R692;R446.1 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2025)06-0747-07

Effect of neutrophil extracellular traps on renal ischemia-reperfusion injury by modulating pyroptosis*

ZHANG Qiuwen^{1,2}, ZHU Lirong¹, YU Yanqing¹, LU Bing^{2,3,4}, LI Haibin^{2,3,4}, SUN Xuyong^{2,3,4△}

1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences at Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Institute of Transplantation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China; 3. Guangxi Clinical Research Center for Organ Transplantation, Nanning, Guangxi 530007, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Organ Donation

* 基金项目:广西壮族自治区重点研发计划项目(桂科 AB24010059);广西壮族自治区自然科学基金区域高发疾病研究联合专项资助项目(2024GXNSFAA010050)。

作者简介:张秋雯,女,在读硕士研究生,主要从事移植免疫学相关研究。△ 通信作者, E-mail:sunxuyong@gxmu.edu.cn。

and Transplantation, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: Objective To investigate the role of neutrophil extracellular traps (NETs) in renal ischemia-reperfusion injury and the relationship between NETs and pyroptosis. **Methods** Thirty C57 mice were randomly divided into ischemia-reperfusion injury group (IRI group), sham-operated group (Sham group) and deoxyribonuclease I group (DNase I group), with 10 mice in each group. The IRI model was constructed by clamping the left and right nephrectomy for 45 min followed by 24 hours reperfusion. DNase I group was injected DNase I at a dose of 2.5 mg/kg 1 hour before ischemia. The renal damage of mice in each group was evaluated by HE staining method. Peripheral blood levels of creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) of mice were measured in each group. Immunofluorescence double staining was used to detect the expression of NETs markers in the renal tissues of each group, including myeloperoxidase (MPO) and lymphocyte antigen 6G (LY6G) protein. Western blotting was employed to determine the levels of citrullinated histone H3 (Cit-H3), NLRP3, gasdermin D (GSDMD) and N-terminal fragment of GSDMD (N-GSDMD) in the renal tissues of each group. Real-time quantitative PCR was used to measure the mRNA levels of NLRP3, interleukin (IL)-1 β and IL-18 in the renal tissues. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to detect cell pyroptosis. **Results** The renal tissue structure in the Sham group was clear, with intact glomerular structure; in the IRI group, some renal tubular epithelial cells exhibited vacuolar degeneration and eosinophilic cytoplasm, increased immunofluorescence intensity of MPO and LY6G in renal tissues; in the DNase I group, vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells was improved, nuclear shedding was reduced, and the immunofluorescence intensity of MPO and LY6G was decreased. The levels of serum Scr and BUN [(292.400 $\pm$ 20.340) μ mol/L, (135.900 $\pm$ 9.980)mmol/L] and the protein expression levels of Cit-H3, NLRP3, GSDMD and N-GSDMD (1.100 $\pm$ 0.107, 3.001 $\pm$ 0.092, 1.120 $\pm$ 0.089, 1.194 $\pm$ 0.122) in the renal tissue in the IRI group were higher than those in the Sham group [(25.880 $\pm$ 7.144) μ mol/L, (24.790 $\pm$ 5.063)mmol/L, 0.302 $\pm$ 0.039, 0.512 $\pm$ 0.108, 0.538 $\pm$ 0.042, 0.735 $\pm$ 0.060], the pyroptosis index of renal cells in the IRI group [(71.920 $\pm$ 12.890)%] was higher than that in the Sham group [(1.000 $\pm$ 0.433)%], mRNA expression levels of NLRP3, IL-1 and IL-18 (2.841 $\pm$ 0.925, 1.725 $\pm$ 0.164, 2.081 $\pm$ 0.394) in the renal tissue were higher than those in the Sham group (1.035 $\pm$ 0.057, 1.008 $\pm$ 0.008, 1.007 $\pm$ 0.011), with statistically significant differences ($P<0.05$). In the DNase I group, the levels of serum Scr and BUN [(31.160 $\pm$ 3.607) μ mol/L, (22.310 $\pm$ 1.897)mmol/L] and the protein expression levels of Cit-H3, NLRP3, GSDMD and N-GSDMD (0.612 $\pm$ 0.107, 0.817 $\pm$ 0.143, 0.466 $\pm$ 0.077, 0.673 $\pm$ 0.050) in the renal tissue were lower than those in the IRI group, pyroptosis index of renal cells [(1.786 $\pm$ 0.345)%] and the mRNA expression levels of NLRP3, IL-1 β and IL-18 (1.162 $\pm$ 0.256, 0.998 $\pm$ 0.093, 1.031 $\pm$ 0.157) in the renal tissue were lower than those in the IRI group, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Ischemia-reperfusion injury can lead to upregulation of NETs expression and promote cell pyroptosis, and inhibition of NETs can alleviate ischemia-reperfusion injury-induced renal injury and cell pyroptosis. NETs may exacerbate renal ischemia-reperfusion injury by promoting cell pyroptosis.

Key words: renal ischemia-reperfusion injury; neutrophil extracellular traps; pyroptosis; inflammatory response; mRNA; protein

肾缺血再灌注损伤在肾移植手术中难以避免,也是急性肾损伤(AKI)的重要诱因。缺血再灌注损伤是指在血液供应中断一段时间后再次恢复供血时,组织和细胞遭受的损伤。缺血再灌注损伤会诱发一系列病理生理反应,其中包括细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、细胞焦亡等,从而导致组织损伤和器官功能障碍^[1-2]。因此,尽早发现肾缺血再灌注损伤对有效防治肾缺血再灌注损伤具有重要意义。细胞焦亡又称

细胞炎症性坏死,其主要特征是细胞在刺激下,细胞膜肿胀、穿孔、破裂,大量的白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)被释放,进而形成诱导炎症微环境^[3-5]。大量研究发现细胞凋亡、焦亡等细胞损伤在缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用,且肾缺血再灌注损伤中存在大量焦亡相关的指标,如 gasdermin D (GSDMD)、GSDMD-N 端片段 (N-GSDMD)、IL-1 β 、IL-18^[6-8]。与此同时,有研究发现 GSDMD 在 AKI 发

展为慢性肾病的进程中具有重要作用^[9]。

中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)由染色质及相关蛋白颗粒组成,是中性粒细胞发挥免疫功能的新形式。NETs通过捕获微生物进而维护机体的健康状态。许多研究发现 NETs 具有组织细胞毒性,与缺血性疾病的发病密切相关^[10-11]。有研究发现在糖尿病肾病、急性肝损伤等疾病中,NETs 介导的细胞焦亡发挥重要的调控作用^[12-13]。然而目前国内外关于 NETs 是否通过调节细胞焦亡进而影响肾缺血再灌注损伤的相关研究较少。故本研究探讨了 NETs 是否参与肾缺血再灌注损伤中细胞焦亡及其潜在调控机制,以期对肾缺血再灌注诱导的肾损伤治疗提供新的策略。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 C57 小鼠购于北京斯贝福生物技术有限公司,体质量 22~25 g,动物生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010。实验用的小鼠根据广西医科大学第二附属医院 SPF 级实验动物中心饲养标准进行喂养。实验方案已通过广西医科大学伦理委员会审核批准[批准文号:2023-KY(0917)]。

1.2 主要试剂与仪器 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)购于上海源叶生物科技有限公司;血肌酐(Scr)检测试剂盒、尿素氮(BUN)检测试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司;末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒均购于碧云天生物技术公司;瓜氨酸化组蛋白(Cit-H3)抗体购于英国 Abcam 公司,髓过氧化物酶(MPO)、淋巴细胞抗原 6G(LY6G)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)抗体均购于成都正能生物技术有限公司, gasdermin D (GSDMD) 购于美国 Affinity 公司,羊抗兔二抗购于武汉爱博泰科生物科技有限公司;细胞组织 RNA 提取试剂盒购于武汉汇宇诚生物技术有限公司;NLRP3、IL-1 β 、IL-18 引物均购于上海生工生物工程有限公司;反转录试剂盒、PCR 试剂盒均购于莫纳生物科技有限公司。组织研磨仪购于上海测博生物科技发展有限公司;低温高速离心机购于美国 Eppendorf 公司;光学显微镜购于日本 Olympus 公司;电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪均购于美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠肾缺血再灌注损伤模型的建立与分组 将 30 只小鼠随机分为假手术组(Sham 组)、肾缺血再灌注损伤组(IRI 组)和 DNase I 组,每组 10 只。IRI 组小鼠使用 1.25%三溴乙醇(200 μ L/10 g)麻醉后开腹,暴露双侧肾蒂,使用无菌无创伤动脉夹夹住小鼠双侧肾蒂,缺血 45 min 后取下夹子后关腹。Sham 组

小鼠麻醉后接受剖腹手术,暴露双侧肾蒂,45 min 后关腹。DNase I 治疗组小鼠术前 1 h 通过腹部注射 DNase I 2.5 mg/kg^[14],之后建立模型的其他操作步骤均同 IRI 组。各组小鼠再灌注 24 h 后,留取小鼠外周血以及肾组织标本。

1.3.2 小鼠血清 Scr、BUN 水平检测 通过小鼠眼球收集各组小鼠外周血,4 $^{\circ}$ C 室温静置,3 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。根据试剂(盒)说明书,在 96 孔板样本孔、标准孔以及空白孔中分别加入上清液、标准品、蒸馏水,向每孔中加入酶溶液 A,孵育 10 min,于 546 nm 处检测吸光度;再向每孔中加入酶溶液 B,孵育 10 min,于 546 nm 处再次检测吸光度,根据试剂(盒)说明书计算 Scr、BUN 水平,从而间接反映小鼠肾功能。

1.3.3 免疫荧光双染检测肾组织中 NETs 标志物 MPO 与 Ly6G 蛋白情况 留取小鼠再灌注后 24 h 肾组织,使用 4%的多聚甲醛对上述肾组织进行充分固定。将组织浸蜡包埋后用切片机切取厚度为 2.5 μ m 的肾组织切片。烤片、脱蜡水化、抗原修复、细胞破膜、室温血清封闭;4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育一抗过夜;室温复温 45 min 后洗涤;室温孵育二抗 45 min,洗涤。DAPI 复染,滴加抗荧光淬灭剂后封片。在荧光显微镜下观察 MPO 与 Ly6G 的荧光强度。

1.3.4 蛋白质印迹法测定肾组织内 Cit-H3、NL-RP3、GSDMD 蛋白及 N-GSDMD 水平 取各组小鼠肾组织标本,加入组织/细胞裂解液后使用组织研磨仪进行充分研磨,研磨后离心取上清液。使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定对应蛋白水平。各组分别以 30 μ g 蛋白依次进行上样、电泳、转膜、封闭、洗膜。4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育一抗过夜、洗膜。室温孵育二抗 1 h、洗膜。显影液孵育 2 min,使用凝胶成像仪进行显影。

1.3.5 TUNEL 染色法检测细胞焦亡情况 小鼠组织留取、固定、切片操作步骤均同 1.3.3。随后对切片进行烘干、固定、洗涤、抗原修复、破膜、通化、孵育、洗涤;复染后封片,观察结果并拍照。组织细胞阳性显示为绿色。

1.3.6 实时荧光定量反转录 PCR(RT-qPCR)检测小鼠肾组织 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 信使 RNA(mRNA)水平 使用小鼠肾组织 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,使用分光光度计检测各组总 RNA 水平,配制反转录反应体系,合成互补 RNA(cDNA),PCR 扩增。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,重复 40 个循环。引物序列:IL-1 β 正向引物 5'-TCGCAGCAGCACATCAACAAG-3',反向引物 5'-TCCACGGGAAAGACACAGGTAG-3';IL-18 正向引物 5'-AGAGACAGCTCAACAGT-

TAAAAGA-3',反向引物 5'-TTGTCTGATTCCAG-GTCTCCA-3';NLRP3 正向引物 5'-TGACCTCT-GTGCTCAAACCA-3',反向引物 5'-TTTA-CAGTCCGGGTGCAGAA-3'。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 的相对表达水平。

1.3.7 HE 染色 对小鼠肾组织依次进行固定、包埋、切片、展片、烤片处理。使用二甲苯脱蜡后再依次进行酒精水化、苏木素浸染、盐酸乙醇分化、促蓝液返蓝、伊红染色、梯度酒精脱水、使用二甲苯透明,封片风干后可进行观察并拍照。

1.4 统计学处理 采用 Graph prism8.0 进行数据处理分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组 Cit-H3 水平及 MPO 与 Ly6G 蛋白情况 Sham 组小鼠肾组织中 Cit-H3 蛋白水平为 0.302 ± 0.039 ,IRI 组为 1.100 ± 0.107 ,DNase I 组为 0.612 ± 0.107 ,3 组 Cit-H3 蛋白水平比较,差异有统计学意义($F=27.88, P<0.01$);IRI 组 Cit-H3 蛋白水平高于 Sham 组($P<0.05$);DNase I 组 Cit-H3 蛋白水平低于 IRI 组($P<0.05$)。MPO 与 LY6G 免疫

荧光共染结果显示,IRI 组肾组织内 MPO 与 LY6G 免疫荧光强度表达增加,DNase I 组肾组织内 MPO 与 LY6G 免疫荧光强度表达减弱。见图 1。

2.2 3 组血清 Scr、BUN 水平比较 与 Sham 组相比,IRI 组血清 Scr、BUN 水平显著升高($P<0.05$);与 IRI 组相比,DNase I 组血清 Scr、BUN 水平显著降低($P<0.05$)。见表 1。

2.3 3 组小鼠肾组织病理变化 夹闭小鼠肾蒂后可见肾脏颜色由粉红色变成暗黑色,IRI 后可见肾脏水肿。HE 染色结果发现,Sham 组小鼠肾脏组织结构清晰,肾小球结构完整;IRI 组可见部分肾小管上皮细胞空泡变性、细胞核固缩、核碎裂,肾小管管腔内出现管型结构,胞质粉染,血管扩张;DNase I 组肾小管上皮细胞空泡变性改善、胞核脱落减轻。见图 2。

表 1 3 组血清 Scr、BUN 水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	Scr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)
Sham 组	10	25.880 $\pm$ 7.144	24.790 $\pm$ 5.063
IRI 组	10	292.400 $\pm$ 20.340 [*]	135.900 $\pm$ 9.980 [*]
DNase I 组	10	31.160 $\pm$ 3.607 [#]	22.310 $\pm$ 1.897 [#]
<i>F</i>		437.5	294.0
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组相比,^{*} $P<0.05$,与 IRI 相比,[#] $P<0.05$ 。

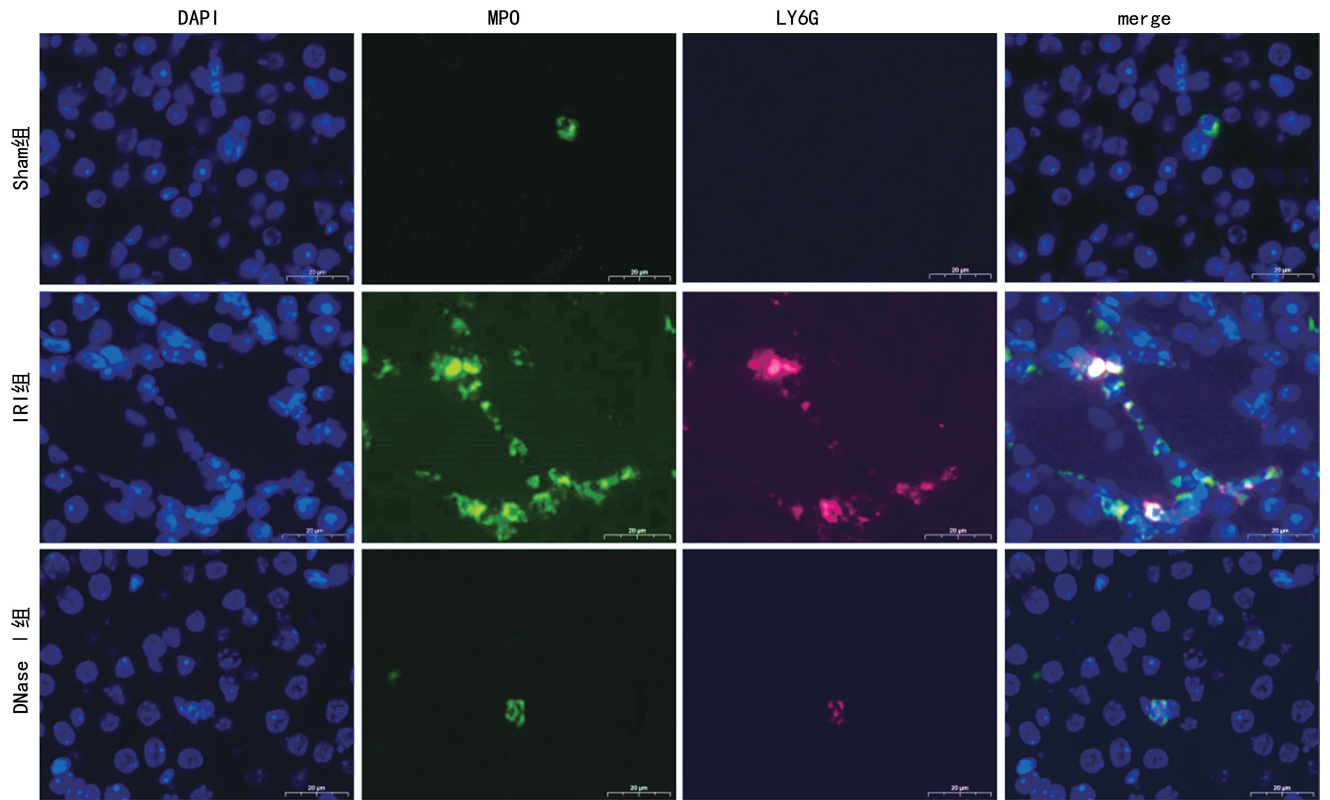


图 1 3 组小鼠肾组织中 NETs 标志物免疫荧光双染结果(200 $\times$)

2.4 3 组小鼠肾组织 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白水平比较 蛋白质印迹检测结果显示:与 Sham

组相比,IRI 组 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白水平均升高($P<0.05$);与 IRI 组相比,DNase I 组 NL-

RP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组小鼠肾组织 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NLRP3 蛋白	GSDMD 蛋白	N-GSDMD 蛋白
Sham 组	10	0.512±0.108	0.538±0.042	0.735±0.060
IRI 组	10	3.001±0.092 [*]	1.120±0.089 [*]	1.194±0.122 [*]
DNase I 组	10	0.817±0.143 [#]	0.466±0.077 [#]	0.673±0.050 [#]
<i>F</i>		136.4	24.63	11.57
<i>P</i>		<0.01	<0.05	<0.05

注：与 Sham 组相比，^{*} $P < 0.05$ ，与 IRI 相比，[#] $P < 0.05$ 。

2.5 3 组小鼠肾脏细胞焦亡情况比较 Sham 组肾脏细胞凋亡指数为 $(1.000 \pm 0.433)\%$ ，IRI 组为 $(71.920 \pm 12.890)\%$ ，DNase I 组为 $(1.786 \pm 0.345)\%$ ，3 组肾脏细胞焦亡指数比较，差异有统计学意义 ($F = 55.85, P < 0.01$)；IRI 组细胞焦亡指数显著高

于 Sham 组 ($P < 0.05$)，而 DNase I 组细胞焦亡指数显著低于 IRI 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.6 3 组小鼠肾组织中 NLRP3、IL-1、IL-18 mRNA 水平比较 与 Sham 组相比，IRI 组 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 水平升高 ($P < 0.05$)；与 IRI 组相比，DNase I 组 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组小鼠肾组织中 NLRP3、IL-1、IL-18 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NLRP3 mRNA	IL-1 β mRNA	IL-18 mRNA
Sham 组	10	1.035±0.057	1.008±0.008	1.007±0.011
IRI 组	10	2.841±0.925 [*]	1.725±0.164 [*]	2.081±0.394 [*]
DNase I 组	10	1.162±0.256 [#]	0.998±0.093 [#]	1.031±0.157 [#]
<i>F</i>		8.116	44.11	27.58
<i>P</i>		<0.05	<0.01	<0.01

注：与 Sham 组相比，^{*} $P < 0.05$ ，与 IRI 相比，[#] $P < 0.05$ 。

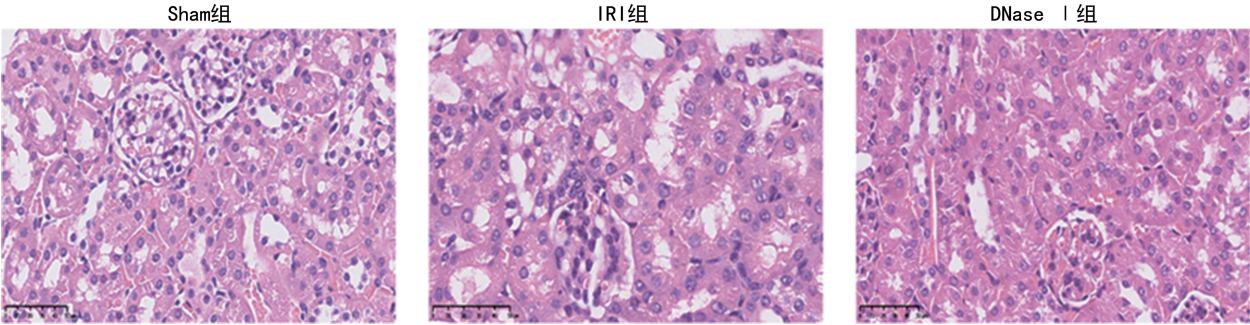


图 2 3 组小鼠肾组织病理变化(HE 染色,200×)

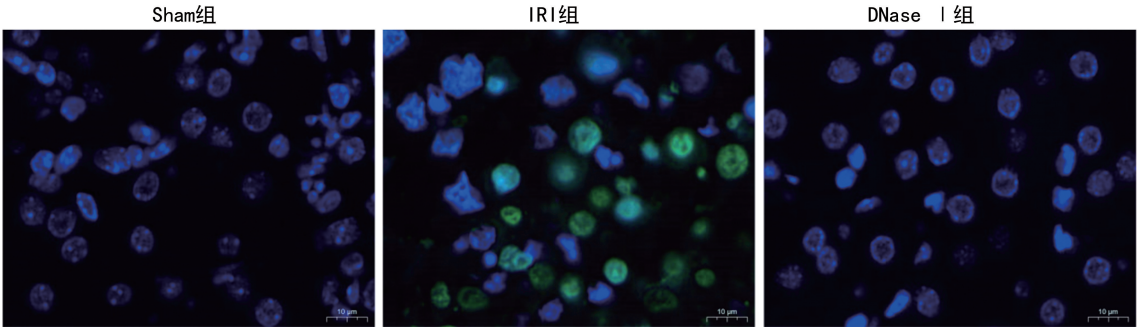


图 3 3 组小鼠肾脏细胞焦亡情况(TUNEL 染色,200×)

3 讨 论

缺血再灌注损伤在器官移植手术过程中不可避免，与器官损伤直接相关。移植术后缺血再灌注损伤是 AKI 的诱因之一，其严重程度可导致移植术后器官功能延迟恢复，其机制可能与缺血和再灌注后诱发的炎症反应、氧化应激相关^[15]。当肾脏发生缺血时，肾近端小管由于其对耗能的需求以及近端血运特殊，导致肾近端小管上皮细胞在缺血缺氧的环境下较容易发生损伤。坏死的细胞可释放内源性损伤相关分子模式(DAMPs)。DAMPs 可与炎症细胞上的模式

识别受体相互作用，使中性粒细胞等炎症细胞向肾脏迁移。而被招募的中性粒细胞可通过吞噬以及释放 NETs 发挥生物学作用。NETs 不仅对机体具有保护作用，而且参与血栓形成以及促进凝血系统的激活，诱导无菌性炎症与氧化应激等损伤^[16]。形成的血栓以及过度的凝血可加重炎症反应与氧化应激，进一步促进 NETs 的生成进而形成恶性循环。这种恶性循环与缺血性疾病的发展进程密切相关。在肝移植术后缺血再灌注损伤中，肝组织内 NETs 的产生可能会引起促炎性细胞因子的释放，其与 MPO、Cit-H3 等

NETs 相关标志物相关^[17]。在心血管疾病中已经明确 NETs 参与心肌缺血再灌注损伤的发展进程^[18]。本研究结果显示,与 Sham 组比较,IRI 组 Cit-H3、MPO 与 Ly6G 蛋白水平显著升高。此外,IRI 组肾组织正常结构消失,部分肾小管上皮细胞空泡变性、细胞核固缩、核碎裂,肾小管管腔内出现管型结构。表明肾缺血再灌注损伤模型稳定建立。DNase I 抑制 NETs 的作用在几十年前已经被关注。在 小鼠肾缺血再灌注损伤模型,发现接受 DNase I 预处理的小鼠肾组织内 Cit-H3、MPO 与 Ly6G 蛋白水平降低,提示 DNase I 可改善肾缺血再灌注损伤^[19]。本研究 DNase I 组小鼠外周血 Scr 与 BUN 的水平降低、肾脏病理损伤程度减轻同样验证了这一观点。

凋亡是肾缺血再灌注损伤中的主要细胞死亡方式,而近年来研究表明细胞焦亡也是肾缺血再灌注损伤中的重要细胞死亡方式^[20]。细胞焦亡是一种炎症级联放大的细胞程序性死亡过程,细胞的主要特征是细胞膜肿胀和破裂,大量炎症因子,如 IL-1 β 、IL-18,被释放到细胞外,加剧炎症微环境的形成^[5]。细胞焦亡是造成肾缺血再灌注损伤中 AKI 的重要机制^[21]。有研究发现焦亡相关蛋白水平在缺血再灌注损伤后显著升高,其中 gasdermin 家族中的 GSDMD、GSDME 在缺血再灌注损伤向 AKI 转变(缺血再灌注损伤—AKI)中具有重要作用,同步抑制 GSDMD 和 GSDME 后可缓解缺血再灌注损伤—AKI^[9]。本研究中,与 Sham 组比较,IRI 组 NLRP3、GSDMD 与 N-GSDMD 蛋白水平显著升高,NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA 水平增加,这验证了缺血再灌注损伤可发生细胞焦亡。有研究证实 NETs 诱导细胞焦亡的发生^[22-23]。本研究结果显示,与 IRI 组相比,DNase I 组小鼠肾组织中 NLRP3、GSDMD、N-GSDMD 蛋白水平降低,细胞焦亡指数减轻。这与既往研究在造影剂诱导的小鼠急性肾损伤中,DNase I 抑制 NETs 可减轻细胞焦亡结果一致^[24]。

综上所述,NETs 参与缺血再灌注损伤的病理生理过程,在使用 DNase I 治疗后,可降低 NETs 相关指标的水平,抑制细胞焦亡,改善缺血再灌注损伤。推测 NETs 可能是导致缺血再灌注损伤发生、发展的新机制,可能成为缺血再灌注损伤治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] SU L,ZHANG J,GOMEZ H,et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury [J]. Autophagy, 2022,19(2):401-414.
[2] ZHAO M,WANG Y,LI L,et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance [J]. Theranostics,2021,11(4):1845-1663.

[3] ZHANG J,WANG G,SHI Y,et al. Growth differentiation factor 11 regulates high glucose-induced cardiomyocyte pyroptosis and diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammasome activation [J]. Cardiovas Diabetol, 2024, 23(1):160.
[4] SLAUFOVA M,KARAKAYA T,DI FILIPPO M,et al. The gasdermins:a pore-forming protein family expressed in the epidermis [J]. Front Immunol,2023,14:1254150.
[5] SHI J,GAO W,SHAO F. Pyroptosis:gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. Trends Biochem Sci,2017,42(4):245-254.
[6] ZHANG H,ZHENG C,XU Y,et al. Comprehensive molecular and cellular characterization of endoplasmic reticulum stress-related key genes in renal ischemia/reperfusion injury [J]. Front Immunol,2024,15:1340997.
[7] MA N,LU H,LI N,et al. CHOP-mediated Gasdermin E expression promotes pyroptosis, inflammation, and mitochondrial damage in renal ischemia-reperfusion injury [J]. Cell Death Dis,2024,15(2):163.
[8] WANG K Y,TANG Z,LIU S,et al. Puerarin protects renal ischemia-reperfusion injury in rats through NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway [J]. Acta Cir Bras,2023,38:e387323.
[9] CHEN Z Y,CHEN C M,LAI K M,et al. GSDMD and GSDME synergy in the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2024,39(8):1344-1359.
[10] GAO J,ZHANG Z,YU J,et al. Identification of neutrophil extracellular trap-related gene expression signatures in ischemia reperfusion injury during lung transplantation;a transcriptome analysis and clinical validation [J]. J Inflamm Res,2024,17:981-1001.
[11] XIE M,HE Z,BIN B,et al. Bulk and single-cell RNA sequencing analysis with 101 machine learning combinations reveal neutrophil extracellular trap involvement in hepatic ischemia-reperfusion injury and early allograft dysfunction[J]. Int Immunopharmacol,2024,131:111874.
[12] ZHENG F,MA L,LI X,et al. Neutrophil extracellular traps induce glomerular endothelial cell dysfunction and pyroptosis in diabetic kidney disease [J]. Diabetes,2022, 71(12):2739-2750.
[13] ZENG F L,ZHANG Y,WANG Z H,et al. Neutrophil extracellular traps promote acetaminophen-induced acute liver injury in mice via AIM2 [J]. Acta Pharmacologica Sinica,2024;45(8):1660-1672.
[14] WANG C L,WANG Y,JIANG Q L,et al. DNase I and sivelestat ameliorate experimental hindlimb ischemia-reperfusion injury by eliminating neutrophil extracellular traps [J]. J Inflamm Res,2023,16:707-721.
[15] ALGOET M,JANSSENS S,HIMMELREICH U,et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. Trends Cardiovasc Med, 2023, 33 (6):357-366.

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 06. 007

血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 联合检测对结直肠癌的诊断价值*

李 颖, 张晓茹, 赵洪煊, 徐进霞, 韩素桂[△]

河北省唐山市人民医院核医学检验科, 河北唐山 063001

摘 要: **目的** 分析血清微小 RNA(miR)-10a、miR-20a、miR-615-3p、癌胚抗原(CEA)、糖基抗原 19-9(CA19-9)联合检测对结直肠癌(CRC)的诊断价值。 **方法** 回顾性选取 2017 年 10 月至 2019 年 2 月该院收治的 50 例 CRC 患者为 CRC 组,另选取同期该院收治的肠道良性疾病患者 50 例为疾病对照组,选取同期在该院体检的 30 例健康体检者为健康对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测各组血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p 水平,采用电化学发光法检测各组血清 CEA、CA19-9 水平。采用多因素 Logistic 回归分析 CRC 发生的影响因素;绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 对 CRC 的诊断价值。 **结果** 疾病对照组患者血清 miR-10a 水平低于健康对照组,而血清 miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CRC 组患者血清 miR-10a 水平低于疾病对照组和健康对照组,而血清 miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平高于疾病对照组和健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同肿瘤最大径、Dukes 分期、细胞分化程度及是否合并淋巴结转移 CRC 患者的血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但不同肿瘤部位及是否规律饮食 CRC 患者的血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示血清 miR-10a 水平升高是 CRC 发生的保护因素($P < 0.05$),血清 miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平升高是 CRC 发生的危险因素($P < 0.05$)。ROC 曲线结果显示,血清 miR-10a、miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 联合检测诊断 CRC 发生的曲线下面积(AUC)为 0.952,显著高于各指标单独检测的 AUC($Z_{\text{联合-miR-10a}} = 3.735, P < 0.001$; $Z_{\text{联合-miR-20a}} = 3.650, P < 0.001$; $Z_{\text{联合-miR-615-3p}} = 4.133, P < 0.001$; $Z_{\text{联合-CEA}} = 4.536, P < 0.001$; $Z_{\text{联合-CA19-9}} = 3.708, P < 0.001$; $Z_{\text{联合-CEA+CA19-9}} = 3.515, P < 0.001$),5 项血清指标联合检测的灵敏度为 92.00%,特异度为 94.00%。 **结论** CRC 患者血清 miR-10a 水平下调,miR-20a、miR-615-3p、CEA、CA19-9 水平上调,5 项血清指标联合检测对于 CRC 具有较好的诊断价值。

关键词: 微小 RNA-10a; 微小 RNA-20a; 微小 RNA-615-3p; 癌胚抗原; 糖基抗原 19-9; 结直肠癌
中图法分类号: R446.1; R735.34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2025)06-0753-07

Value of combined detection of serum miR-10a, miR-20a, miR-615-3p, CEA and CA19-9 in the diagnosis of colorectal cancer*

LI Ying, ZHANG Xiaoru, ZHAO Honghuan, XU Jinxia, HAN Sugui[△]

Department of Nuclear Medicine Laboratory, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063001, China

Abstract: **Objective** To analyze the diagnostic value of combined detection of serum microRNA(miR)-10a, miR-20a, miR-615-3p, carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) in colorectal cancer (CRC). **Methods** Fifty CRC patients admitted to the hospital from October 2017 to February 2019 were retrospectively collected as the CRC group, while 50 patients with intestinal benign lesions admitted to the hospital during the same period were selected as the disease control group and 30 healthy individuals underwent physical examination in the hospital were regarded as the healthy control group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was applied to detect serum levels of miR-10a, miR-20a and miR-615-3p; electrochemiluminescence was applied to detect the levels of serum CEA and CA19-9. The influencing factors of CRC were analyzed by Multivariate Logistic regression. Receiver operating characteristic (ROC) curve was applied to analyze the diagnostic value of serum miR-10a, miR-20a, miR-615-3p, CEA and CA19-9 for CRC. **Results** The serum miR-10a level in the disease control group was obviously lower than that in the

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20191611)。

作者简介:李颖,主管技师,主要从事肿瘤免疫方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: klwgan89@163.com。