

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2025.02.018

论著·基础

# RIP3、HMGB1 在 HK-2 细胞程序性坏死中的表达及作用研究

曹彦卫, 张世球, 王川玲, 俞容, 朱永俊



基金项目: 国家自然科学基金(82060143)

作者单位: 570102 海口, 海南医科大学第一临床医学院肾内科

通信作者: 朱永俊, E-mail: 418207195@qq.com

**【摘要】** 目的 构建人肾小管上皮(HK-2)细胞程序性坏死的模型, 观察受体相互作用蛋白3(RIP3)、高迁移率族蛋白1(HMGB1)在HK-2细胞程序性坏死中的表达和作用机制。方法 于2022年5月—2024年1月在海南医科大学实验室进行实验。取HK-2细胞, 分为control组、TNF- $\alpha$ 组、TNF- $\alpha$  + Nec-1s组、TNF- $\alpha$  + GSK'872组、TNF- $\alpha$  + NSA组, 分别给予相应干预。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡、坏死率; TUNEL + RIP3 荧光双染色结合激光共聚焦显微成像检测 TUNEL + RIP3 阳性细胞百分率; ELISA 法检测 HMGB1 蛋白表达水平; qRT-PCR 检测 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平; Western blot 检测 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平。结果 与 control 组比较, TNF- $\alpha$  组 HK-2 细胞凋亡和坏死率、TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率、HMGB1 蛋白表达量及 RIP3、HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高( $q/P = 56.786/ < 0.001, 47.963/ < 0.001, 24.186/ < 0.001, 5.020/0.034, 4.708/0.047, 46.495/ < 0.001, 26.837/ < 0.001$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较, TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组、TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 HK-2 细胞凋亡和坏死率显著降低( $q/P = 44.243/ < 0.001, 37.666/ < 0.001, 30.324/ < 0.001$ ), TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率显著降低( $q/P = 35.176/ < 0.001, 28.461/ < 0.001, 21.104/ < 0.001$ ), HMGB1 蛋白表达量显著降低( $q/P = 39.043/ < 0.001, 39.412/ < 0.001, 41.510/ < 0.001$ ), RIP3 mRNA 表达显著降低( $q/P = 13.982/ < 0.001, 5.386/0.022, 8.811/ < 0.001$ ), HMGB1 mRNA 表达显著降低( $q/P = 7.219/0.003, 6.318/0.008, 4.658/0.049$ ), RIP3 蛋白表达显著降低( $q/P = 62.436/ < 0.001, 46.495/ < 0.001, 39.853/ < 0.001$ ), HMGB1 蛋白表达显著降低( $q/P = 20.982/ < 0.001, 20.006/ < 0.001, 28.301/ < 0.001$ )。TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组、TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组两两比较, HK-2 细胞凋亡和坏死率、TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率、RIP3 蛋白表达水平差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 TNF- $\alpha$  能诱导 HK-2 细胞发生 RIP3 介导的程序性坏死并释放 HMGB1 分子。

**【关键词】** 程序性坏死; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 受体相互作用蛋白3; 高迁移率族蛋白1**【中图分类号】** R692.5 **【文献标识码】** A

**Expression and effect of RIP3, HMGB1 in necroptosis of HK-2 cells** Cao Yanwei, Zhang Shiqiu, Wang Chuanling, Yu Rong, Zhu Yongjun. Department of Nephrology, Hainan Medical University First Clinical Medical College, Haikou 570102, China

Funding program: National Science Foundation of China (82060143)

Corresponding author: Zhu Yongjun, E-mail: 418207195@qq.com

**【Abstract】 Objective** To construct the model of HK-2 cell programmed necrosis of human renal tubular epithelium (HK-2), and observe the expression and role of receptor interaction protein 3 (RIP3) and high mobility group protein 1 (HMGB1) in HK-2 cell programmed necrosis. **Methods** The experiment will be conducted in the Laboratory of Hainan Medical University from May 2022 to January 2024. HK-2 cells were divided into control group, TNF- $\alpha$  group, TNF- $\alpha$  + Nec-1s group, TNF- $\alpha$  + GSK'872 group and TNF- $\alpha$  + NSA group. Flow cytometry was used to detect apoptosis and necrosis rates in each group of cells. TUNEL + RIP3 fluorescence double staining combined with laser confocal microscopy was used to detect the percentage of TUNEL + RIP3 positive cells. The expression of HMGB1 protein was detected by ELISA. The mRNA expression levels of RIP3 and HMGB1 were detected by qRT-PCR. The expression levels of RIP3 and HMGB1 were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, the apoptosis and necrosis rate of HK-2 cells, the percent-

age of TUNEL + RIP3 double positive cells, the expression level of HMGB1 protein and the mRNA and protein expression levels of RIP3 and HMGB1 in TNF- $\alpha$  group were significantly increased ( $q/P=56.786 < 0.001, 47.963 / < 0.001, 24.186 / < 0.001, 5.020 / 0.034, 4.708 / 0.047, 46.495 / < 0.001, 26.837 / < 0.001$ ). Compared to the TNF- $\alpha$  group, apoptosis and necrosis rate of HK-2 cells, percentage of TUNEL + /RIP3 + double positive cells, HMGB1 protein expression and mRNA and protein expression levels of RIP3, HMGB1 in TNF- $\alpha$  + Nec-1s group, TNF- $\alpha$  + GSK' 872 group and TNF- $\alpha$  + NSA group were significantly decreased (The apoptosis and necrosis rates of HK-2 cells:  $q/P=44.243 / < 0.001, 37.666 / < 0.001, 30.324 / < 0.001$ ; percentage of TUNEL + /RIP3 + double positive cells:  $q/P=35.176 / < 0.001, 28.461 / < 0.001, 21.104 / < 0.001$ ; HMGB1 protein expression:  $q/P=39.043 / < 0.001, 39.412 / < 0.001, 41.510 / < 0.001$ ; RIP3 mRNA expression:  $q/P=13.982 / < 0.001, 5.386 / 0.022, 8.811 / 0.001$ , HMGB1 mRNA expression:  $q/P=7.219 / 0.003, 6.318 / 0.008, 4.658 / 0.049$ , RIP3 protein expression:  $q/P=62.436 / < 0.001, 46.495 / < 0.001, 39.853 / < 0.001$ , HMGB1 protein expression:  $q/P=20.982 / < 0.001, 20.006 / < 0.001, 28.301 / < 0.001$ ). There were statistically significant differences in apoptosis and necrosis rate, percentage of TUNEL + /RIP3 + double positive cells and expression level of RIP3 protein in TNF- $\alpha$  + Nec-1s group, TNF- $\alpha$  + GSK' 872 group and TNF- $\alpha$  + NSA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TNF- $\alpha$  can induce RIP3-mediated necroptosis in HK-2 cells and release HMGB1 molecules.

**[Key words]** Necroptosis; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Receptor-interacting protein 3; High mobility group box-1 protein

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)进展缓慢,是一种不可逆的肾脏功能损害,若治疗不及时,易发展为肾衰竭<sup>[1]</sup>。CKD 主要表现为肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF), TIF 一直被认为是预测病情发展的最佳指标<sup>[2-4]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是一种促炎细胞因子,能够诱导细胞发生程序性坏死<sup>[5]</sup>。当肾组织受损时,免疫细胞释放大量 TNF- $\alpha$ ,其与受体 TNFR1 结合,招募多种下游信号分子,如受体相互作用蛋白-1(receptor interacting protein, RIP1),形成程序性坏死小体的复合物<sup>[6]</sup>。该复合物还包括 RIP3 和混合谱系激酶样结构域,其中 RIP3 最为关键<sup>[7]</sup>。抑制程序性坏死可抑制人肾小管上皮细胞 HK-2 损伤,减轻肾脏炎症反应和肾纤维化程度<sup>[8-10]</sup>。高迁移率蛋白 1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)可介导肾纤维化进展<sup>[11]</sup>。但在 CKD 及肾纤维化发病过程中,程序性坏死的肾小管上皮细胞是否释放 HMGB1,进而促进 TIF 发生发展目前尚不清楚。本研究探讨 RIP3、HMGB1 在 HK-2 细胞发生程序性坏死时的表达和作用机制,为 CKD 及 TIF 的防治提供优化方案给予参考依据,报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 (1) 细胞: HK-2 细胞购自美国 ATCC。(2) 药品及试剂: TNF- $\alpha$ 、细胞培养材料包括 DMEM/F12 培养液、胎牛血清、二甲基亚砜等购自美国 Sigma-Aldrich 公司(货号 H8916、D6421、F8687、D2650); Nec-1s、GSK' 872、NSA、内参兔抗人 GAPDH 购自 Selleck(货号 S8641、S8465、S8251、F0003); Western blot 蛋白抗体选取重组 anti-RIP3 抗体、anti-HMGB1 抗体,购自美国 Abcam 公司(货号 ab305054、

ab18256); 凋亡检测试剂盒购自凯基生物科技有限公司(货号 KGA1102-50); HMGB1 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司(货号 CSB-E08223h); 青霉素-链霉素购自 Gibco(货号 15140148)。(3) 仪器设备: CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo, 型号 BB15)、超净工作台(苏州市安泰技术有限公司, 型号 BSC-06 II B2)、激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司, 型号 OLS5100)、荧光定量 PCR 仪(美国 ABI, 型号 7500)、凝胶成像化学发光一体机(北京森西赛智, 型号 Smart-Gel<sup>®</sup> 6000)等。

1.2 实验方法 于 2022 年 5 月—2024 年 1 月在海南医科大学实验室进行实验。以 HK-2 细胞为研究对象,分为 5 组,每组采用不同处理方法。(1) control 组:仅使用培养基处理 HK-2 细胞,24 h 后收集细胞标本;(2) TNF- $\alpha$  组:使用培养基处理 HK-2 细胞 60 min 后,再使用含有 100  $\mu\text{g/L}$  浓度 TNF- $\alpha$  的培养基进行培养,24 h 后收集细胞标本,构建肾小管上皮细胞程序性坏死模型;(3) TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组:利用含 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度 Nec-1s 的培养基处理 HK-2 细胞 60 min,再使用含有 100  $\mu\text{g/L}$  浓度 TNF- $\alpha$  的培养基进行培养,24 h 内收集 HK-2 细胞标本;(4) TNF- $\alpha$  + GSK' 872 组:使用含有 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度 GSK' 872 的培养基处理 HK-2 细胞 60 min,再使用含有 100  $\mu\text{g/L}$  浓度 TNF- $\alpha$  的培养基进行培养,24 h 内收集 HK-2 细胞标本;(5) TNF- $\alpha$  + NSA 组:使用含 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度 NSA 的培养基处理 HK-2 细胞 60 min,再使用含有 100  $\mu\text{g/L}$  浓度 TNF- $\alpha$  的培养基进行培养,24 h 内收集 HK-2 细胞标本。

## 1.3 观测指标与方法

1.3.1 流式细胞术检测细胞凋亡和坏死率:分别收集

培养 24 h 的各组细胞培养液于离心管中备用, PBS 清洗细胞 2 次, 加入适量不含 EDTA 胰酶进行消化后收集细胞, 终止消化使用对应的原组别培养液。按照说明书采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对细胞凋亡、坏死率进行测定, 重复测定 3 次, 取平均值。

**1.3.2 TUNEL + RIP3 荧光染色结合激光共聚焦显微成像检测 RIP3 蛋白表达:** 将细胞接种于共聚焦培养皿中, 当细胞生长至 70% ~ 80% 时, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 使用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 0.3% TritonX-100 室温透化 20 min。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 山羊血清封闭液 200  $\mu$ l, 室温封闭 60 min。滴加免疫荧光一抗稀释液 1:100 稀释的抗体 RIP3 100  $\mu$ l, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。第二天取出 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。滴加免疫荧光二抗稀释液 1:100 稀释的二抗 100  $\mu$ l, 调节恒温箱温度于 37 $^{\circ}$ C 在避光条件下对其进行孵育。PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。于暗室滴加 TUNEL 试剂盒中混合液, 调节恒温箱温度于 37 $^{\circ}$ C 加盖孵育 70 min。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。滴入少量淬灭剂 (含 DAPI), 孵育 3 ~ 5 min 后在共聚焦显微镜下采集图像并进行观察, 做好每张样本的持续视野评估, 计算阳性细胞占比。

**1.3.3 ELISA 法检测 HMGB1 蛋白表达:** 收集培养 24 h 的各组细胞上清液, 加入等量的裂解液裂解细胞, 与相应的各组细胞上清液混合后, 在 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 将上清转至新的 EP 管中, 按照 ELISA 试剂盒实验步骤检测各组 HMGB1 蛋白浓度。

**1.3.4 qRT-PCR 检测 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平:** 按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 使用第一链合成试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 将总 RNA 反转录成 cDNA, 严格按照 PowerUp SYBR Green Master Mix 说明书通过 qPCR 仪检测 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平。反应条件: UDG 酶激活 50 $^{\circ}$ C 2 min, 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 1 s, 退火/延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共计 40 个循环。引物由通用生物股份有限公司设计并提供, 引物序列如下: RIP3 上游引物 5'-ATGTCGTGCGTCAAGTTATGG-3', 下游引物 5'-CGTAGCCCCACTTCCTATGTTG-3'; HMGB1 上游引物 5'-TATGGCAAAAAGCGGACAAGG-3', 下游引物 5'-CTTCGCAACATCACCAATGGA-3'; GAPDH 上游引物 5'-GAGAAGTATGACAACAGCCTCAA-3', 下游引物 5'-GCCATCAGGCCACAGTTT-3'。以 GAPDH 为内参,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 RIP3、HMGB1 mRNA 的相对表达量。

**1.3.5 Western blot 检测 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平:** 各组细胞均用 RIPA 缓冲液 (RIPA: PMSF = 1:100) 冰上裂解匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下离心收集检测蛋白浓度并配平。使用 15  $\mu$ g 蛋白质进行样品上样, 将蛋白质进行凝胶电泳分离转膜。使用 WB 快速封闭液进行封闭, 封闭时间为 30 min。添加一抗体: RIP3 (浓度比例为 1:1000)、HMGB1 (浓度比例为 1:1000)、GAPDH (浓度比例为 1:1000), 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。第 2 天 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入二抗 (1:15000), 室温孵育 1 h, 滴加超敏 ECL 显影液, 室温静置 2 min。采用凝胶成像系统进行扫描分析, 以 GAPDH 为内参, 计算 RIP3、HMGB1 蛋白的相对表达量。

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差表示, 多组间比较采用 *F* 检验, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF- $\alpha$  诱导的 HK-2 细胞损伤的影响** 与 control 组比较, TNF- $\alpha$  组 HK-2 细胞凋亡和坏死率显著升高 ( $q/P = 56.786 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组、TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 HK-2 细胞凋亡和坏死率显著降低 ( $q/P = 44.243 / < 0.001$ 、 $37.666 / < 0.001$ 、 $30.324 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较, TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组凋亡和坏死率显著升高 ( $q/P = 6.577 / < 0.001$ 、 $13.919 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  + GSK'872 组比较, TNF- $\alpha$  + NSA 组凋亡和坏死率显著升高 ( $q/P = 7.342 / 0.003$ ), 见图 1、图 2。

**2.2 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF- $\alpha$  诱导的 HK-2 细胞 RIP3 蛋白表达的影响** 5 组细胞 TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率比较, 差异有统计学意义 ( $F/P = 317.785 / < 0.001$ ), 与 control 组比较, TNF- $\alpha$  组 TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率升高 ( $q/P = 47.963 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组、TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率降低 ( $q/P = 35.176 / < 0.001$ 、 $28.461 / < 0.001$ 、 $21.104 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较, TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率显著升高 ( $q/P = 6.715 / < 0.001$ 、 $14.072 / < 0.001$ ); 与 TNF- $\alpha$  + GSK'872 组比较, TNF- $\alpha$  + NSA 组 TUNEL + RIP3 双阳性细胞百分率显著升高 ( $q/P = 7.358 / 0.003$ ), 见图 3、图 4。

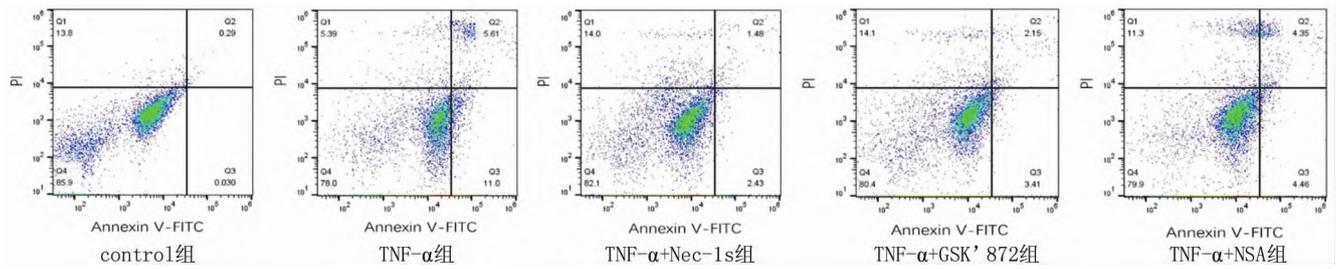
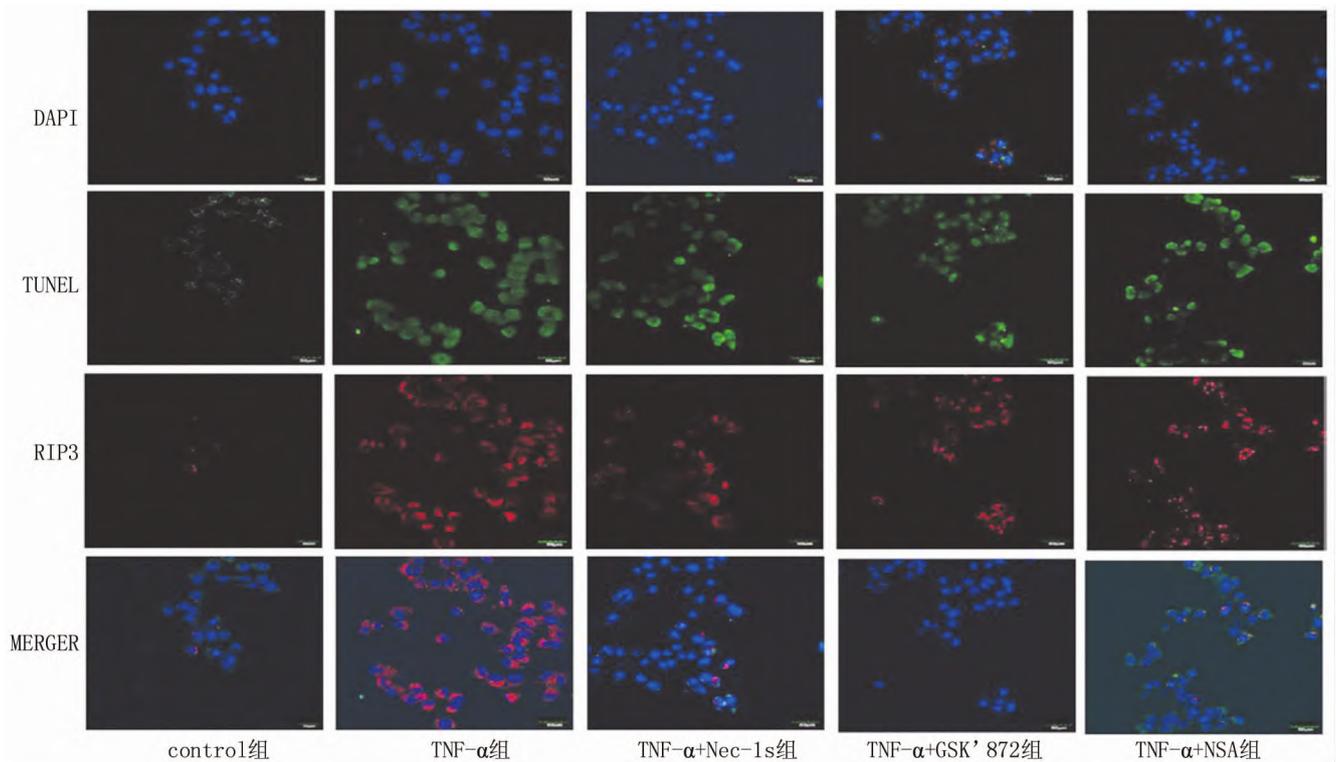


图 1 各组 HK-2 细胞 Annexin V-FITC 染色后流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死(右下象限和右上象限)的代表性结果

Fig. 1 Representative results apoptosis and necrosis (lower right quadrant and upper right quadrant) measured of flow cytometry after Annexin V-FITC staining of HK-2 cells in each group



注:蓝色(DAPI)所染细胞核;绿色(TUNEL)所染凋亡细胞;红色显示阳性程序性坏死因子 RIP3,比例尺为 50 μm。

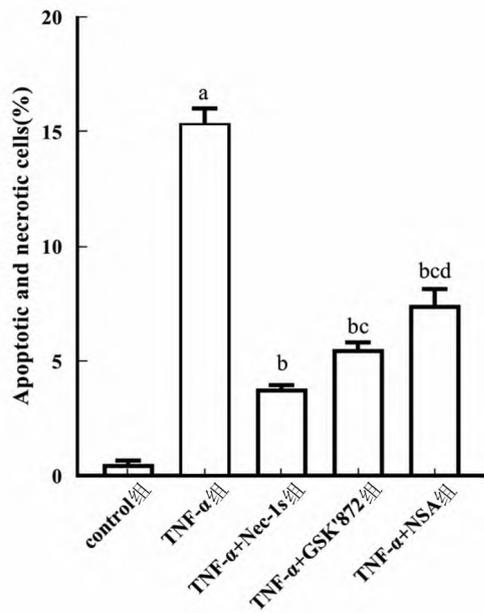
图 3 HK-2 细胞中程序性坏死特异性蛋白 RIP3 + TUNEL 荧光共染(免疫荧光染色, ×200)

Fig. 3 Fluorescent co-staining of the specific protein RIP3 + TUNEL in programmed necrosis in HK-2 cells (immunofluorescence staining, ×200)

2.3 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF-α 诱导的 HK-2 细胞 HMGB1 蛋白的影响 与 control 组 (9.66 mg/L ± 0.79 mg/L) 比较, TNF-α 组 (18.19 mg/L ± 0.42 mg/L) HK-2 细胞 HMGB1 蛋白表达量上调 ( $q/P = 24.186 / < 0.001$ )。与 TNF-α 组比较, TNF-α + Nec-1s 组 (4.42 mg/L ± 0.16 mg/L)、TNF-α + GSK'872 组 (4.29 mg/L ± 0.91 mg/L)、TNF-α + NSA 组 (3.35 mg/L ± 0.46 mg/L) 蛋白表达量降低 ( $q/P = 39.043 / < 0.001, 39.412 / < 0.001, 41.510 / < 0.001$ ), 且 TNF-α + Nec-1s 组、TNF-α + GSK'872 组、TNF-α +

NSA 组间差异无统计学意义 ( $q/P = 0.369 / 0.999, 2.467 / 0.452, 2.098 / 0.594$ )。

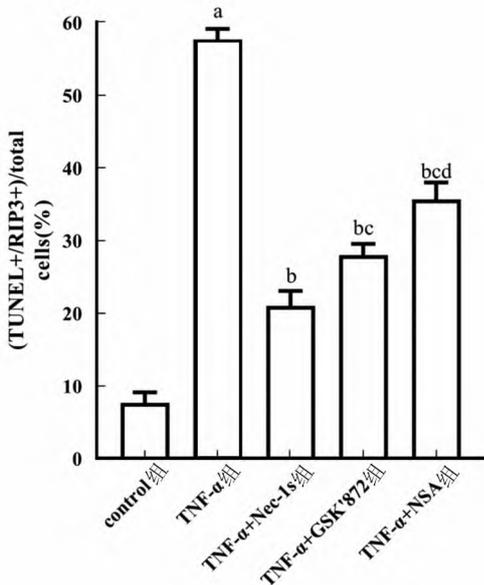
2.4 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF-α 诱导的 HK-2 细胞 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平的影响 与 control 组比较, TNF-α 组 HK-2 细胞 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平升高 ( $q/P = 5.020 / 0.034, 4.708 / 0.047$ ); 与 TNF-α 组比较, TNF-α + Nec-1s 组、TNF-α + GSK'872 组、TNF-α + NSA 组 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平降低 (RIP3 mRNA:  $q/P = 13.982 / < 0.001, 5.386 / 0.022, 8.811 / 0.001$ ; HMGB1 mRNA:  $q/P = 7.219 / 0.003,$



注:与 control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 TNF- $\alpha$  组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  + GSK'872 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组 HK-2 细胞凋亡和坏死百分比统计图

Fig. 2 Statistical diagram of percentage of apoptosis and necrosis of HK-2 cells in each group



注:与 control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 TNF- $\alpha$  组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  + GSK'872 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 各组 HK-2 细胞 RIP3 阳性表达比较

Fig. 4 Comparison of RIP3 positive expression in HK-2 cells in each group

6.318/0.008、4.658/0.049);与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较,TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 RIP3 mRNA

表达水平升高 ( $q/P = 8.569/0.001$ 、 $5.171/0.028$ ), HMGB1 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ( $q/P = 0.900/0.965$ 、 $2.560/0.419$ );TNF- $\alpha$  + GSK'872 组和 TNF- $\alpha$  + NSA 组间 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平差异亦无统计学意义 ( $q/P = 3.425/0.186$ 、 $1.660/0.766$ ), 见表 1。

表 1 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF- $\alpha$  诱导的 HK-2 细胞 RIP3、HMGB1 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effects of Nec-1s, GSK'872 and NSA on mRNA expression levels of RIP3 and HMGB1 in TNF- $\alpha$ -induced HK-2 cells

组别	n	RIP3 mRNA	HMGB1 mRNA
control 组	3	0.767 $\pm$ 0.062	0.430 $\pm$ 0.157
TNF- $\alpha$ 组	3	1.000 $\pm$ 0.107 <sup>a</sup>	1.000 $\pm$ 0.345 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ + Nec-1s 组	3	0.351 $\pm$ 0.070 <sup>b</sup>	0.126 $\pm$ 0.073 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ + GSK'872 组	3	0.750 $\pm$ 0.091 <sup>bc</sup>	0.235 $\pm$ 0.242 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ + NSA 组	3	0.591 $\pm$ 0.062 <sup>bc</sup>	0.436 $\pm$ 0.111 <sup>b</sup>
F 值		26.727	7.746
P 值		<0.001	<0.001

注:与 control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.5 Nec-1s、GSK'872、NSA 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 HK-2 细胞 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平的影响

5 组细胞 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 ( $F/P = 545.824/ < 0.001$ 、 $128.405/ < 0.001$ )。与 control 组比较,TNF- $\alpha$  组 HK-2 细胞 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平升高 ( $q/P = 46.495/ < 0.001$ 、 $26.837/ < 0.001$ );与 TNF- $\alpha$  组比较,TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组、TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 RIP3、HMGB1 蛋白表达水平降低 (RIP3 蛋白: $q/P = 62.436/ < 0.001$ 、 $46.495/ < 0.001$ 、 $39.853/ < 0.001$ ;HMGB1 蛋白: $q/P = 20.982/ < 0.001$ 、 $20.006/ < 0.001$ 、 $28.301/ < 0.001$ );与 TNF- $\alpha$  + Nec-1s 组比较,TNF- $\alpha$  + GSK'872 组、TNF- $\alpha$  + NSA 组 RIP3 蛋白表达水平显著升高 ( $q/P = 15.941/ < 0.001$ 、 $22.583/ < 0.001$ ), TNF- $\alpha$  + NSA 组 HMGB1 蛋白表达水平显著下降 ( $q/P = 7.319/ 0.003$ ),TNF- $\alpha$  + GSK'872 组 HMGB1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $q/P = 0.976/ 0.954$ );与 TNF- $\alpha$  + GSK'872 组比较,TNF- $\alpha$  + NSA 组 RIP3 蛋白表达水平显著升高 ( $q/P = 6.642/ 0.006$ ),HMGB1 蛋白表达水平显著下降 ( $q/P = 8.295/ 0.001$ ),见图 5、表 2。

### 3 讨论

炎症反应损伤与 TIF 的发生发展联系紧密,TNF- $\alpha$  等炎症因子加重肾组织炎症反应损伤,致肾组织发生 TIF<sup>[12]</sup>。研究发现,肾小管上皮细胞在受到 TNF- $\alpha$  刺激时,会发生 RIP3/MLKL 依赖的程序性坏死<sup>[13]</sup>。

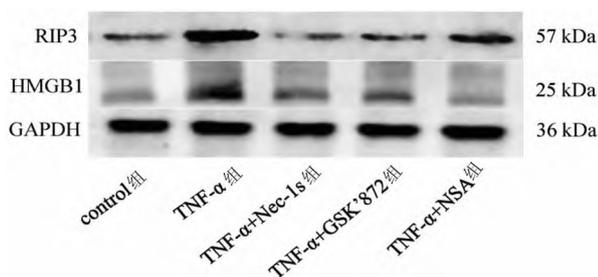


图 5 各组 RIP3、HMGB1 蛋白表达情况

Fig. 5 Expression of RIP3 and HMGB1 in each group

表 2 各组 RIP3、HMGB1 蛋白表达比较

Tab. 2 Comparison of RIP3 and HMGB1 protein expression in each group

组别	n	RIP3 蛋白	HMGB1 蛋白
control 组	3	0.61 ± 0.02	0.27 ± 0.04
TNF-α 组	3	1.31 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>a</sup>
TNF-α + Nec-1s 组	3	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>b</sup>
TNF-α + GSK872 组	3	0.61 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>b</sup>
TNF-α + NSA 组	3	0.71 ± 0.03 <sup>bed</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>bed</sup>
F 值		545.824	128.405
P 值		<0.001	<0.001

注:与 control 组比较,<sup>a</sup>P < 0.05;与 TNF-α 组比较,<sup>b</sup>P < 0.05;与 TNF-α + Nec-1s 组比较,<sup>c</sup>P < 0.05;与 TNF-α + GSK872 组比较,<sup>d</sup>P < 0.05。

RIP3 蛋白通过其 RHIM 结构与 RIPK1 相互作用并被激活,然后与 MLKL 结合形成一个称为 necrosome 的复合物,从而引发细胞的程序性坏死<sup>[14]</sup>。值得注意的是,发生程序性坏死的细胞可以被 Nec-1 特异性抑制,不会因凋亡抑制剂(如 Z-VAD)受到影响<sup>[15-16]</sup>。

本研究根据文献<sup>[17]</sup>选择 TNF-α 诱导 HK-2 细胞发生程序性坏死,应用 RIP1、RIP3、MLKL 抑制剂干预细胞程序性坏死模型,以程序性坏死关键信号分子 RIP3 作为检测指标验证细胞程序性坏死模型构建是否成功。通过应用流式细胞术检测发现,HK-2 细胞经 TNF-α 诱导后,其凋亡或坏死率明显增加。应用 Nec1s、GSK'872、NSA 干预后,凋亡和坏死率明显降低。且 RIP3 + TUNEL 荧光共染结果显示,TNF-α 组中 TUNEL + RIP3 双阳性细胞的百分比显著增加。经 Nec-1s、GSK'872、NSA 处理后,TUNEL + RIP3 双阳性细胞的百分比有所降低。上述结果与朱永俊等<sup>[13]</sup>的研究一致,说明 TNF-α 确实能够诱导 HK-2 细胞发生程序性坏死。此外,qPCR、Western blot 检测结果显示,RIP3 在 TNF-α 诱导后明显上调,给予抑制剂后表达下调,与文献一致<sup>[17]</sup>,说明 TNF-α 能够诱导肾小管上皮细胞发生 RIP3 介导的程序性坏死。

HMGB1 作为 DAMPs 一个常见的炎性介质,通过与其相应的受体结合参与炎症反应,促进肾脏纤维化

的发生发展,HMGB1 与肾纤维化严重程度及慢性肾脏病的临床表现及预后转归可能相关<sup>[18-19]</sup>。三氯乙烯致敏小鼠肾小管上皮细胞有坏死症状,小鼠受损肾小管表现大量 TNF-α、HMGB1 和 PIP3<sup>[20]</sup>。且 TNF-α 刺激 HK-2 细胞后 HMGB1 分泌增强<sup>[21]</sup>。本研究通过 qPCR、Western blot 检测发现,HK-2 细胞经 TNF-α 干预后 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平显著增高,预处理 Nec-1s、GSK'872、NSA 后降低,与上述研究一致,说明 HK-2 细胞发生程序性坏死时,HMGB1 表达增加,且 HMGB1 表达量与程序性坏死严重程度相关。ELISA 法定量检测上清液 HMGB1 蛋白浓度,结果显示,TNF-α 组浓度明显增高,经 Nec-1s 抑制剂及其他药物干预后含量降低,同样说明 HK-2 细胞发生程序性坏死越重,HMGB1 蛋白表达量越高。

综上所述,HK-2 细胞可在 TNF-α 的诱导下发生 RIP3 依赖的程序性坏死,发生程序性坏死的细胞释放 HMGB1, HMGB1 作为 DAMPs 一个常见的炎性介质,在 CKD 及肾纤维化发生发展过程中可能发挥着重要作用,其具体机制有待进一步深入研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

曹彦卫:实施实验操作,数据统计分析,撰写论文;张世球、王川玲:实施实验操作;俞容:数据统计分析;朱永俊:提出研究方向、思路,课题设计,论文审核

参考文献

- [1] Evans M, Lewis RD, Morgan AR, et al. A narrative review of chronic kidney disease in clinical practice: Current challenges and future perspectives[J]. Adv Ther, 2022, 39(1):33-43. DOI: 10.1007/s12325-021-01927-z.
- [2] Goncalves LED, Andrade-Silva M, Basso PJ, et al. Vitamin D and chronic kidney disease: Insights on lipid metabolism of tubular epithelial cell and macrophages in tubulointerstitial fibrosis[J]. Front Physiol, 2023, 14:1145233. DOI: 10.3389/fphys.2023.1145233.
- [3] 倪玉芳, 张璐娜, 张琼, 等. 肾纤康通过调节 Smad3 介导的铁死亡缓解 CKD 小鼠肾纤维化[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(6):1097-1104. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2024.06.016.
- [4] 林永强, 陈恬恬, 王超超, 等. 慢性肾脏病患者血清 HIF-1α、TGF-β1 与肾小管间质纤维化及疾病进展的关系[J]. 中华全科医学, 2021, 19(11):1868-1871, 1978. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.002188.
- [5] 曹力元, 牟为. 程序性坏死的诱导剂和抑制剂及其在疾病中作用的研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2020, 40(11):1524-1529. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.11.016
- [6] Xu C, Wu J, Wu Y, et al. TNF-α-dependent neuronal necroptosis regulated in Alzheimer's disease by coordination of RIPK1-p62 complex with autophagic UVRAG[J]. Theranostics, 2021, 11(19):9452-9469. DOI: 10.7150/thno.62376.
- [7] Kieckhöfer E, Slaats GG, Ebert LK, et al. Primary cilia suppress Ripk3-mediated necroptosis[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1):

477. DOI: 10.1038/s41420-022-01272-2.
- [8] Guo M, Chen Q, Huang Y, et al. High glucose-induced kidney injury via activation of necroptosis in diabetic kidney disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023:2713864. DOI: 10.1155/2023/2713864.
- [9] Xiao X, Du C, Yan Z, et al. Inhibition of necroptosis attenuates kidney inflammation and interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *American Journal of Nephrology*, 2017, 46(2):131-138. DOI: 10.1159/000478746.
- [10] Wei J, Chen L, Wang D, et al. Upregulation of RIP3 promotes necroptosis via a ROS dependent NF- $\kappa$ B pathway to induce chronic inflammation in HK2 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5):783. DOI: 10.3892/mmr.2021.12423.
- [11] Fu Y, Xiang Y, Wang Y, et al. The STAT1/HMGB1/NF- $\kappa$ B pathway in chronic inflammation and kidney injury after cisplatin exposure[J]. *Theranostics*, 2023, 13(9):2757-2773. DOI: 10.7150/thno.81406.
- [12] 杨梦凡, 范桢亮, 尹日平, 等. 肾小管间质纤维化发病机制的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2021, 22(2):186-188. DOI:10.3969/j.issn.1009-587X.2021.02.030.
- [13] 朱永俊, 俞容, 李晓燕, 等. Ang II 联合 TNF- $\alpha$  促使肾小管上皮 HK-2 细胞发生程序性坏死[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(6):1084-1090. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2021.06.016.
- [14] Hassanein EHM, Ibrahim IM, Abd El-Maksoud MS, et al. Targeting necroptosis in fibrosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(12):10471-10484. DOI:10.1007/s11033-023-08857-9.
- [15] 吕向阳, 任晓爽, 张良, 等. 柚皮素下调 RIP1-RIP3-MLKL 信号通路抑制多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(3):483-489. DOI:10.12360/CPB202310037.
- [16] Hu BF, Gong Q, Chen SQ, et al. Protective effect of inhibiting necroptosis on gentamicin-induced nephrotoxicity[J]. *FASEB J*, 2022, 36(9):e22487. DOI: 10.1096/fj.202200163R.
- [17] Lin Z, Chen A, Cui H, et al. Renal tubular epithelial cell necroptosis promotes tubulointerstitial fibrosis in patients with chronic kidney disease[J]. *The FASEB Journal*, 2022, 36(12):e22625. DOI:10.1096/fj.202200706RR.
- [18] Liu T, Li Q, Jin Q, et al. Targeting HMGB1: A potential therapeutic strategy for chronic kidney disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(15):5020-5035. DOI: 10.7150/ijbs.87964.
- [19] Deng Y, Zhang T, Cai Y, et al. Confrontation with kidney inflammation through a HMGB1-targeted peptide augments anti-fibrosis therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1871(2):167586. DOI: 10.1016/j.bbadis.2024.167586.
- [20] 王赟灿. TNF- $\alpha$ /TNFR1 轴调控 RIPK3/MLKL 信号介导的肾小管上皮细胞程序性坏死在三氯乙烯致敏小鼠肾脏损伤中的作用研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2022.
- [21] Seo MS, Kim HJ, Kim H, et al. Ethyl pyruvate directly attenuates active secretion of HMGB1 in proximal tubular cells via induction of heme oxygenase-1[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(5):629. DOI: 10.3390/jcm8050629.

(收稿日期:2024-10-11)

作者·编者·读者

## 撰写医学论文主体部分的要求

- 前言** 概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。仅提供与研究主题紧密相关的参考文献,切忌写成文献综述。一般以 200~300 个汉字为宜,占全文字数的 5% 左右。
- 资(材)料与方法** 实验研究论文常写成“材料与方法”,临床研究论文常写成“资料与方法”。
  - 研究对象**:研究对象为人,需注明时间、地点、分组方法、一般情况、选择标准与排除标准等,并说明经所在单位伦理委员会批准,研究对象知情同意。研究对象为实验动物,需注明动物的名称、种系、雌雄、年龄、饲养条件、健康状况及合格证号等。
  - 药品、试剂及仪器、设备**:药品及化学试剂使用通用名称,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位及给药途径。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围,无须描述工作原理。
  - 观察指标与方法**:选用相应观察指标,详述新创的方法及改良方法的改进之处,以备他人重复。采用他人方法,以引用参考文献的方式给出即可。
  - 统计学方法** 说明所使用的统计学软件及版本,明确资料的表达及统计学方法的选择。用  $\bar{x} \pm s$  表达服从或近似服从正态分布的计量资料,可采用 *t* 检验、方差分析;用  $M(Q_1, Q_3)$  表达呈偏态分布的计量资料或生存时间资料,可采用秩和检验,若考虑协变量的影响,可采用协方差分析;用频数或构成比(%)表达计数资料或等级资料,可采用卡方检验或秩和检验。
- 结果** 是指与设计的观察指标相对应的实(试)验所得数据、观察记录,经过综合分析和统计学处理的结果,而不是原始数据,更不是原始记录。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述所获得的结果。结果的叙述应实事求是,简洁明了,数据准确,层次清楚,逻辑严谨。以数据反映结果时,应注意不能只描述导数(如百分数),还应同时给出据以计算导数的绝对数。一般应对所得数据进行统计学处理,并给出具体的统计检验值,如: $t=2.85, P<0.01$ 。
- 讨论** 是对研究结果的科学解释与评价,是研究所形成的科学理论,不必重述结果部分具体数据或资料。着重讨论研究结果的创新之处及从中导出的结论,包括理论意义、实际应用价值、局限性,及其对进一步研究的启示。应将本研究结果与其他有关的研究相比较,并将本研究结论与目的联系起来讨论,同时列出相关参考文献。
- 结论** 是对研究结果和论点的提炼与概括,如果推导不出结论,可在讨论中写一结束语。