



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2023.02.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.02.015

· 临床研究 ·

# 白细胞介素-1 受体相关激酶 1 在脂多糖诱导的足细胞损伤中的作用及其机制

陈慧敏 李霞 郎娅婷 盛清浩 吕智美

**[摘要]** **目的** 探讨白细胞介素(IL)-1 受体相关激酶 1 (IRAK1) 在脂多糖(LPS) 诱导的足细胞损伤中的作用及其机制。**方法** 将体外培养的永生化人足细胞分为 5 组: 正常对照组(control 组)、LPS 组、LPS + 空载转染组(LPS + si-NC 组)、LPS + IRAK1 干扰质粒转染组(LPS + si-IRAK1 组)、LPS + 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 干扰质粒转染组(LPS + si-TRAF6 组)。采用蛋白质免疫印迹法(Western Blot) 及实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR) 分别检测 5 组足细胞 IRAK1 和 TRAF6 蛋白及其 mRNA 的相对表达水平; 采用免疫荧光检测 5 组足细胞紧密连接蛋白(ZO)-1、结蛋白(Desmin) 的定位及相对表达水平; 采用 Western Blot 检测 5 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、核因子(NF)- $\kappa$ B 抑制蛋白(IKB) $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B (p65)、磷酸化 NF- $\kappa$ B (p-p65) 蛋白的相对表达水平; 采用免疫共沉淀(Co-IP) 实验检测 IRAK1 和 TRAF6 结合情况。**结果** LPS 组足细胞 IRAK1、TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平均高于 control 组, LPS + si-IRAK1 组足细胞上述指标均低于 LPS 组( $P < 0.05$ )。LPS 组、LPS + si-NC 组足细胞 Desmin、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均高于 control 组, ZO-1、IKB- $\alpha$  蛋白相对表达水平均低于 control 组; LPS + si-IRAK1 组、LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组、LPS + si-NC 组, ZO-1、IKB- $\alpha$  蛋白相对表达水平均高于 LPS 组、LPS + si-NC 组( $P < 0.05$ )。Co-IP 实验结果显示 IRAK1 与 TRAF6 存在结合。**结论** LPS 诱导足细胞发生损伤并激活炎症反应, 调控 IRAK1 通过靶向 TRAF6/NF- $\kappa$ B 通路减轻 LPS 导致的足细胞损伤。

**[关键词]** 脂多糖; 足细胞; 白细胞介素-1 受体相关激酶 1; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6

**[中图分类号]** R392.12; R589

**[文献标识码]** A

**Role and its mechanism of interleukin-1 receptor associated kinase 1 in lipopolysaccharide-induced podocyte injury** Chen Huimin\*, Li Xia, Lang Yating, Sheng Qinghao, Lv Zhimei. \* Department of Nephrology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan 250021, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the role and its mechanism of interleukin (IL)-1 receptor associated kinase (IRAK) 1 in lipopolysaccharide (LPS)-induced podocyte injury. **Methods** Immortalized human podocytes cultured in vitro were divided into 5 groups: normal control group (control group), LPS group, LPS + null transfection group (LPS + si-NC group), LPS + IRAK1 interference plasmid transfection group (LPS + si-IRAK1 group), LPS + tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) interference plasmid transfection group (LPS + si-TRAF6 group). Western blotting and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect relative expression levels of IRAK1 and TRAF6 protein and mRNA in podocytes of 5 groups. Localization and relative expression levels of zonula occludens (ZO)-1 and Desmin in podocytes of 5 groups were detected by immunofluorescence. Relative expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , human nuclear factor (NF)- $\kappa$ B inhibitor (IKB) $\alpha$ , NF- $\kappa$ B (p65) and phosphorylated NF- $\kappa$ B (p-p65) in podocytes of 5 groups were detected by Western blotting. CO-Immunoprecipitation (Co-IP) experiment was used to detect the combination of IRAK1 and TRAF6.

**Results** Relative expression levels of IRAK1 and TRAF6 protein and mRNA in podocytes of LPS group were higher than those in control group, and above indexes in podocytes of LPS + si-IRAK1 group were higher than those in LPS group ( $P < 0.05$ ). Relative expression levels of Desmin, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , p65, p-p65 protein in podocytes of LPS group, LPS + si-NC group were higher than those in control group, relative expression levels of ZO-1 and IKB- $\alpha$  protein were lower than those in control group; relative

作者单位: 250021 济南, 山东第一医科大学附属省立医院肾内科(陈慧敏、郎娅婷、盛清浩、吕智美); 山东大学附属省立医院肾内科(李霞)

通讯作者: 吕智美, E-mail: lyzhimei@126.com

expression levels of Desmin, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , p65, p-p65 protein in podocytes of LPS + si-IRAK1 group, LPS + si-TRAF6 group were lower than those in LPS group and LPS + si-NC group, relative expression levels of ZO-1 and IKB- $\alpha$  protein were higher than those in LPS group and LPS + si-NC group ( $P < 0.05$ ). Co-IP experiment showed that IRAK1 and TRAF6 were combined. **Conclusion** LPS induces injury to podocyte and activates inflammatory response, and regulation of IRAK1 attenuates lipopolysaccharide-induced podocyte injury by targeting TRAF6/NF- $\kappa$ B pathway.

**[Key words]** Lipopolysaccharide; Podocytes; Interleukin-1 receptor associated kinase1; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

糖尿病肾病 (DKD) 是全球肾衰竭最常见的原因之一,影响约 1/3 的糖尿病患者<sup>[1]</sup>。DKD 是一种以进行性肾小球基质扩张为特征的多阶段临床综合征,导致肾小球基底膜增厚、系膜扩张、肾小球内皮细胞损伤和足细胞丢失<sup>[2]</sup>。足细胞是终末分化和高度特化的肾小球上皮细胞,目前普遍认为足细胞损伤可作为 DKD 演变的临床预测因子<sup>[3-5]</sup>。白细胞介素 (IL)-1 受体相关激酶 1 (IRAK1) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的一员,与 IL-1 受体和 Toll 样受体 (TLR) 信号转导关系密切,在先天免疫和炎症相关疾病中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。Zhang 等<sup>[8]</sup>研究证实 IRAK1 在糖尿病患者及小鼠中表达水平升高,沉默 IRAK1 表达可通过 PI3K/AKT 信号通路抑制炎症和细胞凋亡减轻肾损伤。Zheng 等<sup>[9]</sup>发现微小 RNA (MIR)-146A-5P 可通过调控 IRAK1 靶点抑制肿瘤坏死因子 (TNF) 受体相关因子 6 (TRAF6)/核因子 (NF)- $\kappa$ B 通路改善急性胰腺炎中的炎症反应和细胞自噬。本研究采用脂多糖 (LPS) 处理人足细胞以构建足细胞损伤的体外模型,以期研究 IRAK1 在足细胞损伤中的作用及分子机制。

## 材料与方法

1. 材料:永生化人足细胞系由美国 Peter Mundel 教授惠赠;RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;TRIzol 购自 TaKaRa 公司、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RIPA 裂解液、LPS 购自北京索莱宝科技有限公司;双抗青链霉素混合液、免疫共沉淀试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自 Abcam 公司;阴性对照、IRAK1 及 TRAF6 干扰质粒由吉满生物科技上海有限公司构建。

## 2. 方法

(1) LPS 储存液的配制:将 1 mg LPS 粉末完全溶解于 1 ml RPMI-1640 完全培养基,得到 1 mg/ml 的储存液,细胞培养时,使其终质量浓度为 50 ng/ml。

(2) 细胞培养及分组:足细胞在含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基、37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。细胞密度达 50%~60% 时按 Lipofectamine™

3000 说明书转染干扰质粒。将足细胞分为 5 组,每组  $1 \times 10^6$  个细胞:①正常对照组 (control 组):正常培养基培养细胞 48 h;②LPS 组:含 LPS 的培养基培养细胞 48 h;③~⑤LPS + 空载转染组 (LPS + si-NC 组)、LPS + IRAK1 干扰质粒转染组 (LPS + si-IRAK1 组)、LPS + TRAF6 干扰质粒转染组 (LPS + si-TRAF6 组):分别采用空载质粒、IRAK1 干扰质粒、TRAF6 干扰质粒转染 8~12 h 后均加 LPS 溶液培养细胞 48 h。

(3) 细胞总 RNA 提取及实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测:采用 TRIzol 法提取足细胞的总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度后进行逆转录和体外扩增,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  法计算目的基因 (IRAK1、TRAF6 mRNA) 的相对表达水平。

(4) 细胞总蛋白提取及蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 检测:提取各组总蛋白,测定浓度后向 10% 的聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶上样孔中加入 20  $\mu$ g 蛋白,电泳及转膜后封闭 1 h,4  $^{\circ}$ C 孵育一抗 [IRAK1、TRAF6、紧密连接蛋白 (ZO)-1、结蛋白 (Desmin)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、人核因子 (NF)- $\kappa$ B 抑制蛋白 (IKB)- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B (p65)、磷酸化 NF- $\kappa$ B (p-p65)] 过夜。室温孵育二抗 1 h,洗膜后进行化学发光成像,并用 Image J 软件进行半定量分析表示蛋白相对表达水平。

(5) 免疫荧光:细胞爬片经不同处理后,4% 多聚甲醛室温固定,0.1% Triton X-100 破膜,5% BSA 溶液室温封闭,一抗工作液 (Desmin、ZO-1) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗工作液 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,DAPI 核染后防荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察拍照。

(6) 免疫共沉淀 (Co-IP) 实验:提取足细胞总蛋白,用 IRAK1 抗体或同种属 IgG 抗体与 protein A/G 磁珠及总蛋白 4  $^{\circ}$ C 缓慢摇晃过夜孵育,将混有抗体和结合蛋白的磁珠洗脱,用 SDS-PAGE 检测 IRAK1 与 TRAF6 是否结合。

3. 统计学处理:应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。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,两组间比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. control 组和 LPS 组足细胞 IRAK1 蛋白及 mRNA

相对表达水平比较:LPS 组足细胞 IRAK1 蛋白及 mRNA 相对表达水平均高于 control 组( $1.39 \pm 0.09$  比  $0.66 \pm 0.08$ ;  $1.67 \pm 0.12$  比  $1.06 \pm 0.06$ ,  $P$  均  $< 0.05$ )。

2. control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较:control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组、LPS + si-NC 组足细胞 Desmin 蛋白相对表达水平均高于 control 组,ZO-1 蛋白相对表达水平均低于 control 组( $P < 0.05$ )。LPS + si-IRAK1 组足细胞 Desmin 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组、LPS + si-NC 组,ZO-1 蛋白相对表达水平均高于 LPS 组、LPS + si-NC 组( $P < 0.05$ )。而其余各组间两两比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 1、2 及表 1。

表 1 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	Desmin	ZO-1
control 组	$1.21 \pm 0.11$	$1.26 \pm 0.11$
LPS 组	$1.87 \pm 0.08^a$	$0.53 \pm 0.06^a$
LPS + si-NC 组	$1.77 \pm 0.08^a$	$0.57 \pm 0.07^a$
LPS + si-IRAK1 组	$1.14 \pm 0.09^{bc}$	$1.15 \pm 0.19^{bc}$
$F$ 值	41.768	31.413
$P$ 值	$< 0.001$	$< 0.001$

注:与 control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS + si-NC 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

3. control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IKB- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较:control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IKB- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组、LPS + si-NC 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均高于 control 组,IKB- $\alpha$  蛋白相对表达水平均低于 control 组( $P < 0.05$ )。LPS + si-IRAK1 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组、LPS + si-NC 组,IKB- $\alpha$  蛋白相对表达水平均高于 LPS 组、LPS + si-NC 组( $P < 0.05$ )。而其余各组间两两比

较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

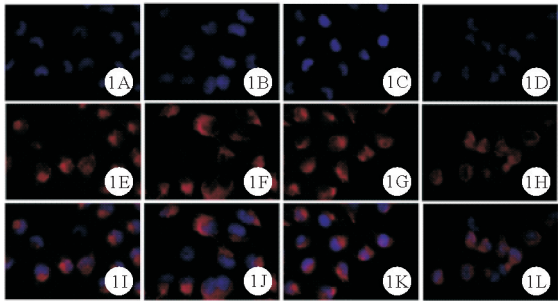


图 1 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 Desmin 蛋白表达情况(A ~ D:control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组 DAPI 核染结果;E ~ H:4 组 Desmin 蛋白表达情况;I ~ L:4 组细胞核与 Desmin 蛋白 merge 结果;免疫荧光染色,  $\times 200$ )

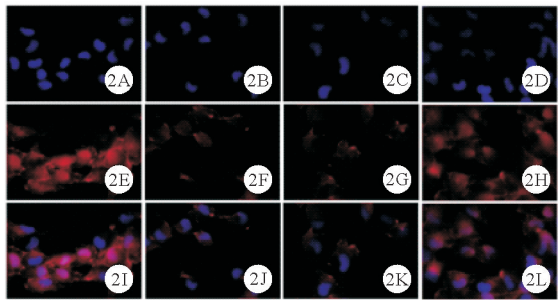


图 2 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 ZO-1 蛋白表达情况(A ~ D:control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组 DAPI 核染结果;E ~ H:4 组 ZO-1 蛋白表达情况;I ~ L:4 组细胞核与 ZO-1 蛋白 merge 结果;免疫荧光染色,  $\times 200$ )

4. control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较:control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组、LPS + si-NC 组足细胞 Desmin 蛋白相对表达水平均高于 control 组,ZO-1 蛋白相对表达水平均低于 control 组( $P < 0.05$ )。LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组、LPS + si-NC 组,ZO-1 蛋白相对表达水平均高于 LPS 组、LPS + si-NC 组( $P < 0.05$ )。而其余各组间

表 2 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IKB- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IKB- $\alpha$	p65	p-p65
control 组	$1.12 \pm 0.06$	$1.51 \pm 0.25$	$1.48 \pm 0.18$	$1.12 \pm 0.20$	$0.74 \pm 0.26$	$0.66 \pm 0.21$
LPS 组	$1.65 \pm 0.13^a$	$2.40 \pm 0.38^a$	$2.66 \pm 0.10^a$	$0.70 \pm 0.26^a$	$1.67 \pm 0.18^a$	$1.54 \pm 0.19^a$
LPS + si-NC 组	$1.63 \pm 0.08^a$	$2.61 \pm 0.17^a$	$2.59 \pm 0.11^a$	$0.64 \pm 0.17^a$	$1.60 \pm 0.20^a$	$1.61 \pm 0.25^a$
LPS + si-IRAK1 组	$1.16 \pm 0.08^{bc}$	$1.64 \pm 0.07^{bc}$	$1.61 \pm 0.14^{bc}$	$1.08 \pm 0.19^{bc}$	$0.80 \pm 0.13^{bc}$	$0.60 \pm 0.15^{bc}$
$F$ 值	29.778	14.858	61.056	5.145	19.183	21.731
$P$ 值	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	0.031	$< 0.001$	$< 0.001$

注:与 control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS + si-NC 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$



表 4 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、IKB-α、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α	IKB-α	p65	p-p65
control 组	1.39 ± 0.14	1.28 ± 0.07	1.39 ± 0.07	1.02 ± 0.24	0.69 ± 0.16	0.66 ± 0.19
LPS 组	2.67 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.14 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.13 <sup>a</sup>
LPS + si-NC 组	2.66 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.92 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.19 <sup>a</sup>
LPS + si-TRAF6 组	1.49 ± 0.08 <sup>bc</sup>	1.31 ± 0.07 <sup>bc</sup>	1.36 ± 0.11 <sup>bc</sup>	1.08 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.76 ± 0.14 <sup>bc</sup>	0.58 ± 0.11 <sup>bc</sup>
F 值	75.214	145.172	200.926	4.763	15.352	20.647
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.029	<0.001	<0.001

注：与 control 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与 LPS + si-NC 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$

两两比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3、4 及表 3。

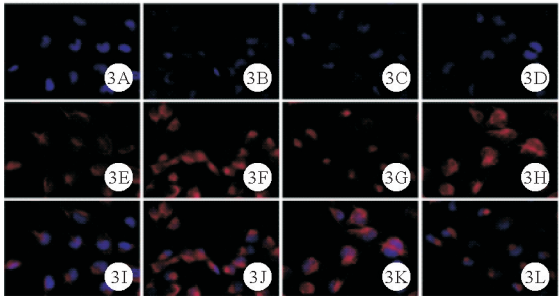


图 3 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin 蛋白表达情况(A ~ D: control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组 DAPI 核染结果;E ~ H:4 组 Desmin 蛋白表达情况;I ~ L:4 组细胞核与 Desmin 蛋白 merge 结果;免疫荧光染色, ×200)

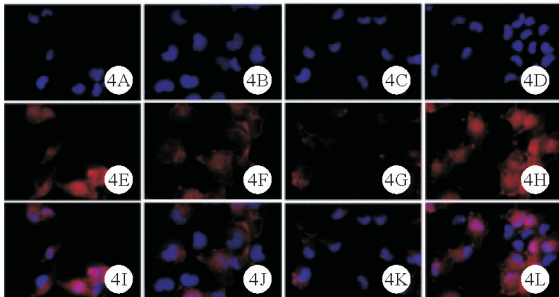


图 4 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 ZO-1 蛋白表达情况(A ~ D: control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组 DAPI 核染结果;E ~ H:4 组 ZO-1 蛋白表达情况;I ~ L:4 组细胞核与 Desmin 蛋白 merge 结果;免疫荧光染色, ×200)

表 3 control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 Desmin、ZO-1 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	Desmin	ZO-1
control 组	0.74 ± 0.06	1.09 ± 0.14
LPS 组	1.14 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.07 <sup>a</sup>
LPS + si-NC 组	1.16 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>a</sup>
LPS + si-TRAF6 组	0.64 ± 0.09 <sup>bc</sup>	1.15 ± 0.08 <sup>bc</sup>
F 值	21.737	28.082
P 值	<0.001	<0.001

注：与 control 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与 LPS + si-NC 组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$

5. control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6

组足细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、IKB-α、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较：control 组、LPS 组、LPS + si-NC 组及 LPS + si-TRAF6 组足细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、IKB-α、p65、p-p65 蛋白相对表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组、LPS + si-NC 组足细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均高于 control 组，IKB-α 蛋白相对表达水平均低于 control 组( $P < 0.05$ )。LPS + si-TRAF6 组足细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组、LPS + si-NC 组，IKB-α 蛋白相对表达水平高于 LPS 组、LPS + si-NC 组( $P < 0.05$ )。而其余各组间两两比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 4。

6. control 组、LPS 组及 LPS + si-IRAK1 组足细胞 TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平比较：LPS 组足细胞 TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平均高于 control 组( $1.87 \pm 0.23$  比  $1.12 \pm 0.17$ ;  $1.79 \pm 0.09$  比  $1.15 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ )。LPS + si-IRAK1 组足细胞 TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平均低于 LPS 组( $0.93 \pm 0.21$  比  $1.87 \pm 0.23$ ;  $0.87 \pm 0.16$  比  $1.79 \pm 0.09$ ,  $P$  均  $< 0.05$ )。

7. Co-IP 实验检测 IRAK1 与 TRAF6 结合情况：阳性对照条带证明足细胞可表达 IRAK1、TRAF6 蛋白；免疫沉淀(IP) IgG 未见结合条带，证明实验中不存在与 IgG 的非特异结合；IP IRAK1 条带表示利用蛋白 IRAK1 进行沉淀实验，IRAK1 与 TRAF6 均被沉淀，由此证实 IRAK1 与 TRAF6 之间存在相互作用。见图 5。

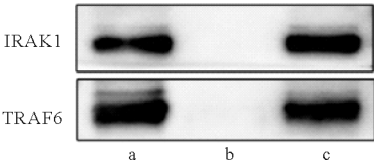


图 5 Co-IP 实验结果(a:阳性对照;b:IP IgG;c:IP IRAK1)

讨 论

DKD 是糖尿病最常见的并发症之一，也是慢性肾脏病的主要原因，最终可致终末期肾病甚至死亡<sup>[10-11]</sup>。足细胞已被证实是 DKD 中肾脏损伤的重要靶点，在维

持稳态方面面临特殊挑战<sup>[12]</sup>。足细胞损伤的特征是特异性蛋白下调,包括 nephrin、WT1 及 ZO-1<sup>[13]</sup>;Desmin 是一种细胞中间纤维,足细胞受损时在肾小球中高度表达,也是足细胞损伤的典型指征<sup>[14]</sup>。本实验利用 LPS 处理足细胞后,其 ZO-1、Desmin 蛋白异常表达,证明成功构建 DKD 足细胞损伤的体外模型。

大量证据表明,IRAK1 是免疫信号通路的核心,参与多种疾病的发生发展,如恶性肿瘤、代谢紊乱(如糖尿病)、感染和非传染性免疫疾病<sup>[15]</sup>。本研究中 LPS 组足细胞 IRAK1 蛋白和 mRNA 相对表达水平显著升高,为研究足细胞损伤提供了新方向。尽管 DKD 传统上被认为是一种非免疫性疾病,但越来越多的临床和动物模型研究表明,先天免疫系统的激活和炎症机制在 DKD 的发病机制中起着重要作用<sup>[16]</sup>。本实验中 LPS 组足细胞炎性因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平高于 control 组,LPS + si-IRAK1 组足细胞上述指标均低于 LPS 组,表明 LPS 诱导足细胞发生炎症反应,敲低 IRAK1 可调控 NF- $\kappa$ B 通路进而抑制炎性因子释放而影响细胞功能,证明 IRAK1 在 DKD 的发生和发展中起着重要作用。

NF- $\kappa$ B 信号通路参与免疫、炎症反应、细胞生长发育过程<sup>[17]</sup>,且与细胞中其他信号通路组成包含正、负调控的完整信号转导途径<sup>[18]</sup>。TRAF6 作为 E3 泛素连接酶,可激活 I $\kappa$ B 激酶(IKK),导致 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和 P65 核易位,是 NF- $\kappa$ B 信号激活的信号传感器<sup>[19]</sup>。本实验中 LPS 组足细胞 TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平均高于 control 组,且 LPS + si-TRAF6 组足细胞 ZO-1、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白相对表达水平均低于 LPS 组,证明 TRAF6 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调节炎症过程,与 Gao 等<sup>[20]</sup>研究结果一致。为了探讨 IRAK1 与 TRAF6 之间的调控关系,我们敲低 IRAK1 后检测足细胞 TRAF6 蛋白和 mRNA 相对表达水平,结果显示,LPS + si-IRAK1 组足细胞 TRAF6 蛋白及 mRNA 相对表达水平均低于 LPS 组,表明 TRAF6 受到 IRAK1 的调控,且 Co-IP 实验证实二者存在结合。因此我们推断,LPS 诱导足细胞后,IRAK1 通过与 TRAF6 结合并调控其活性,进而靶向 NF- $\kappa$ B 通路,导致足细胞损伤和炎症反应的发生。

然而,本研究仍存在一定局限性,仅探讨了 IRAK1 在足细胞损伤体外模型中的作用和机制,并未涉及体内实验部分,我们将在未来进一步探讨。

综上所述,IRAK1 是 DKD 足细胞损伤信号转导通路的重要组成部分。沉默 IRAK1 表达可通过 TRAF6/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制炎症反应从而改善肾脏损伤,

IRAK1/TRAF6/NF- $\kappa$ B 环可能为 DKD 的分子机制探讨提供新见解,从而为治疗 DKD 提供新的理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] An L, Yu Q, Chen L, et al. The Association Between the Decline of eGFR and a Reduction of Hemoglobin A1c in Type 2 Diabetic Patients [J]. *FrontEndocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:720-723.
- [2] Lassén E, Bouchareb R, Daehn IS. Podocyte as the link between sterile inflammation and diabetic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(4):688-690.
- [3] Jin J, Shi Y, Gong J, et al. Exosome secreted from adipose-derived stem cells attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy flux and inhibiting apoptosis in podocyte [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):95-96.
- [4] 赵婷, 张芳菲, 尹建永, 等. 肾脏酶减轻高糖诱导的足细胞损伤 [J]. *中国临床医学*, 2021, 28(4):603-609.
- [5] 刘洋, 赵锦, 胡翠宁, 等. 2 型糖尿病肾病患者尿分泌体足细胞标志蛋白、二肽基肽酶 IV 与尿白蛋白/尿肌酐相关性 [J]. *临床军医杂志*, 2021, 49(6):692-694.
- [6] Cai B, Liu Y, Chong Y, et al. IRAK1-regulated IFN- $\gamma$  signaling induces MDSC to facilitate immune evasion in FGFR1-driven hematological malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):165.
- [7] Wu X, Xu M, Liu Z, et al. Pharmacological inhibition of IRAK1 and IRAK4 prevents endothelial inflammation and atherosclerosis in ApoE (-/-) mice [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175:106043.
- [8] Zhang Y, Chen X, Yuan L, et al. Down-regulation of IRAK1 attenuates podocyte apoptosis in diabetic nephropathy through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(3):529-535.
- [9] Zheng C, Ji Z, Xu Z, et al. Overexpression of miR-146a-5p Ameliorates Inflammation and Autophagy in TLCs-Induced AR42J Cell Model of Acute Pancreatitis by Inhibiting IRAK1/TRAF6/NF- $\kappa$ B Pathway [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(3):416-425.
- [10] 于群, 胡锦涛, 贾磊. TRIM58 通过抑制 WNT/ $\beta$ -catenin 通路参与脂多糖诱导的足细胞损伤 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(6):497-504.
- [11] 任珍珍, 陈继玲, 汪伟环, 等. 艾塞那肽对早期糖尿病肾病患者微量白蛋白、肾功能、胰岛  $\beta$  细胞功能的影响 [J]. *临床内科杂志*, 2022, 39(8):550-552.
- [12] Liu M, Liang K, Zhen J, et al. Sirt6 deficiency exacerbates podocyte injury and proteinuria through targeting Notch signaling [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):413.
- [13] Guo C, Ding Y, Yang A, et al. CHILKBP protects against podocyte injury by preserving ZO-1 expression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 80(1):18.
- [14] Liu B, Lu R, Li H, et al. Zhen-wu-tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF- $\kappa$ B pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59:152913.
- [15] Zheng Y, He JQ. Interleukin Receptor Associated Kinase 1 Signaling and Its Association with Cardiovascular Diseases [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2022, 23(3):97.
- [16] Zheng Z, Zheng F. Immune Cells and Inflammation in Diabetic Nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:1841690.
- [17] 权联蛟, 秦婧婧, 权元鼎. 丹参提取物抑制高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡的机制研究 [J]. *临床内科杂志*, 2020, 37(5):371-374.
- [18] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF $\kappa$ B system [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8(3):227-241.
- [19] Meng Q, Liang C, Hua J, et al. A miR-146a-5p/TRAF6/NF- $\kappa$ B p65 axis regulates pancreatic cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance [J]. *Theranostics*, 2020, 10(9):3967-3979.
- [20] Gao W, Zhang Y. Depression of lncRNA MINCR antagonizes LPS-evoked acute injury and inflammatory response via miR-146b-5p and the TRAF6-NF $\kappa$ B signaling [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):124.

(收稿日期:2022-09-23)

(本文编辑:周三凤)