

IRF8 靶向铁死亡在急性肺损伤中的作用及机制研究



王佳¹, 李忻炎², 李琳钰³, 张晓晶², 杨娟³, 折志刚¹

1. 武汉大学人民医院心内科 (武汉 430060)
2. 武汉大学基础医学院 (武汉 430071)
3. 赣南医科大学赣南创新与转化医学研究院 (江西赣州 341000)

【摘要】目的 探讨干扰素调节因子 8 (interferon regulatory factor 8, *IRF8*) 在急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 中的作用及其机制。方法 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和蛋白免疫印迹 (WB) 检测体内外 ALI 模型中 *IRF8* mRNA 和蛋白的表达。体外构建稳定过表达和敲低 *IRF8* 的 A549 细胞系, 采用 RT-qPCR 检测炎症相关基因 mRNA 的表达; WB 检测凋亡相关基因的表达。分别选取 12 只同窝阴性对照小鼠和 12 只 *Irf8* 敲除品系小鼠, 构建 ALI 模型, 收集造模后的小鼠肺组织并称量; 收集并检测肺泡灌洗液中总细胞数以及总蛋白含量。采用苏木精-伊红染色及免疫荧光分析肺组织炎症浸润情况; 利用 RT-qPCR 检测 *Irf8* 敲除小鼠肺组织炎症相关基因 mRNA 的表达; TUNEL 染色分析肺组织凋亡情况; 采用 WB 分别在体内外 ALI 模型中检测铁死亡相关信号分子的蛋白表达。结果 *IRF8* 在体内体外 ALI 中表达上调; 体外敲低 *IRF8* 加剧细胞内炎症以及细胞凋亡, 反之, 过表达 *IRF8* 可在体外 ALI 模型中发挥保护作用; 敲除 *Irf8* 加重小鼠肺损伤; 进一步机制探索发现 *IRF8* 通过调控铁死亡相关信号分子表达从而减轻肺损伤。结论 *IRF8* 通过靶向铁死亡在肺损伤中发挥保护作用, 为肺损伤的治疗提供潜在靶点。

【关键词】 *IRF8*; 急性肺损伤; 铁死亡; 炎症; 凋亡

Role and mechanism of *IRF8* targeting ferroptosis in the pathogenesis of acute lung injury

WANG Jia¹, LI Xinyan², LI Linyu³, ZHANG Xiaojing², YANG Juan³, SHE Zhigang¹

1. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

3. Gannan Innovation and Translational Medicine Research Institute, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Corresponding authors: YANG Juan, Email: yangjuancat@whu.edu.cn; SHE Zhigang, Email: zgshe@whu.edu.cn

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202403082

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82260020); 湖北省工程研究中心创新能力建设项目 (2020-420111-73-03-072238); 国家重点研发计划“基础科研条件与重大科学仪器设备开发”重点专项 (2016YFF0101504)

通信作者: 杨娟, 博士, 特聘教授, 研究员, Email: yangjuancat@whu.edu.cn

折志刚, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: zgshe@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore the role and mechanisms of interferon regulatory factor 8 (*IRF8*) in the pathogenesis of acute lung injury (ALI). **Methods** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western blots (WB) were used to detect the expression of *IRF8* protein and mRNA in models of lung injury both *in vivo* and *in vitro*. *IRF8* stable overexpression and knockdown A549 cell lines were established *in vitro*, and the expression levels of inflammation-related genes at the transcriptional level were detected using RT-qPCR. WB analysis was employed to assess the expression of apoptosis-related genes. Each group of 12 wild type (WT) mice and *Irf8* knockout mice was selected to establish the model of ALI. Collect lung tissues from the modeled mice and weigh them. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and assessed for total cell count and total protein content. Hematoxylin-eosin (HE) staining and immunofluorescence (IF) analyses were performed to evaluate lung tissue inflammation infiltration. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of inflammation-related genes in the lung tissue of *Irf8* knockout mice. The content of apoptosis in lung tissue was detected by TUNEL staining. *In vivo* and *in vitro*, the protein expression of ferroptosis-related signaling molecules was assessed by WB. **Results** The expression of *IRF8* is upregulated both in mRNA and protein levels in ALI. *IRF8* knockdown exacerbates intracellular inflammation and cell apoptosis *in vitro*. Conversely, *IRF8* overexpression can exert a protective effect *in vitro*. *Irf8* knockout further exacerbates lung injury *in vivo*. Mechanistically, *IRF8* alleviates lung injury by regulating the expression of ferroptosis-related signaling molecules. **Conclusion** *IRF8* exerts a protective role in lung injury by targeting ferroptosis, providing a potential target for the treatment of lung injury.

【Keywords】 Interferon regulatory factor 8; Acute lung injury; Ferroptosis; Inflammation; Apoptosis

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由于直接或间接损伤因素导致肺部损伤的危重呼吸疾病, 其发病机制复杂, 死亡率居高不下。严重情况下进一步进展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 临床表现为呼吸困难和顽固性低氧血症^[1]。ALI/ARDS 的发病机制核心涉及肺泡-毛细血管屏障的通透性改变, 从而导致级联放大的炎症反应和肺泡上皮细胞的损伤^[2]。虽然近年来对 ALI/ARDS 发病机制以及治疗策略的研究取得了一些进展, 但其确切的演变和具体信号通路调控尚不明确, 且暂无针对特定靶点的治疗方法^[3-5]。因此, 研究 ALI/ARDS 的病理生理机制, 发现有效的调控因子、拟定有效的治疗策略显得尤为重要。

干扰素调节因子 (interferon regulatory factors, IRFs) 作为先天免疫系统的重要组成部分, 在细胞增殖调控、分化、信号转导及免疫反应等方面发挥重要的调节作用^[6-7]。其中, 干扰素调节因子 8 (interferon regulatory factor 8, *IRF8*) 作为一种

免疫调节基因, 在免疫系统中亦扮演着关键角色。早期研究表明, *IRF8* 不仅参与树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和 B 细胞等多种免疫细胞的发育和分化, 还参与了肺部炎症的调节^[8-9]。此外, 既往研究发现 *IRF8* 作为肿瘤细胞铁死亡调节因子来调节肿瘤相关疾病的进展^[10]。铁死亡是一种由于细胞内铁离子过载而引起的新型细胞死亡方式, 与肿瘤的发展和治理密切相关^[11]。*IRF8* 分子不仅在免疫系统调节中发挥着重要作用, 还通过调节铁死亡相关信号通路, 影响肿瘤细胞的生存和死亡, 为进一步探索 *IRF8* 在其他疾病治疗中的潜在作用提供了新的方向和可能性。最近研究表明, 铁死亡与 ALI/ARDS 的发病机制密切相关, 针对铁死亡的调控策略成为治疗 ALI/ARDS 的新途径^[12]。然而尚未有研究阐明 *IRF8* 在 ALI/ARDS 中扮演的角色, 因此, 本研究旨在探究 *IRF8* 在 ALI/ARDS 中的生物学功能及其作用机制, 有助于拓展其发病机制, 并为 ALI/ARDS 的治疗提供新的靶点和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和饲养

选用 12 只雄性 *Irf8* 敲除品系 (*Irf8* KO) 小鼠与 12 只雄性同窝阴性对照 (WT) 小鼠, 小鼠年龄为 8~10 周龄, 体重约为 23.5~27.5 g。实验所用 C57BL/6J 小鼠均购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证 [SCXK (京) 2019-0010], 使用许可证 [SYXK (鄂) 2024-0013], 其中 *Irf8* 敲除品系小鼠引种自 Infrafrontier 公司。小鼠均饲养于武汉大学人民医院动物实验中心, 其中 SPF 级小鼠饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司。小鼠饲养环境温度保持在 22~24 °C、湿度保持在 40%~70% 之间; 明暗交替各 12 h, 自由摄食饮水。所有动物实验均是双盲进行。本研究已获得武汉大学人民医院动物伦理委员会审核批准 [批号: WDRM 动 (福) 第 20230508B 号]。

1.1.2 细胞

人肺泡上皮细胞 A549 购买于中国典藏中心。

1.1.3 主要试剂和仪器

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自赛默飞世尔科技公司; 兔源一抗 *IRF8*、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、BAX、BCL₂ 及溶质载体家族 7 (solute carrier family 7 member 11, SCL7A11) 抗体均购自于爱博泰客生物科技有限公司; BAD、p-BAD 及 GAPDH 抗体均购自于美国 Cell Signaling Technology 公司; HRP 标记的羊抗兔二抗购自中山以诺生物科技有限公司; 慢病毒载体、慢病毒包装质粒 (pMD2.G 和 psPAX2) 和 Cas9 表达载体均购自于 Addgene 公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 电泳仪和 ChemiDoc MP 成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; DAPI 购自深圳欣博盛生物科技有限公司; CD11b、CD68 一抗购自美国 Boster 公司; Ly6G 一抗购自赛维尔科技有限公司; TRIzol 试剂和 TUNEL 试剂盒均购自于江西惠康生物科技有限公司; 反转录试剂盒和 SYBR 试剂盒均购自于诺维赞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型构建与分组

小鼠麻醉后, 以仰卧位固定在操作台上,

倾斜 50°。造模组 (ALI) 小鼠采用 10 mg · kg⁻¹ 的 LPS 以气管内滴注的方式进行造模, 假手术组 (Sham) 小鼠气管内滴注等体积的 0.9% 氯化钠溶液, 滴注期间小鼠体位保持直立以确保充分吸收 LPS。滴注后等待 24 h, 小鼠 ALI 模型构建完成。最后利用腹腔注射戊巴比妥钠 (90 mg · kg⁻¹) 麻醉, 收集小鼠肺泡灌洗液和肺脏组织。

本研究将小鼠随机分为 4 组, 分别为 WT-ALI 组、*Irf8* KO-ALI 组、WT-Sham 组和 *Irf8* KO-Sham 组, 每组各 6 只。其中, WT-ALI 组采用 10 mg · kg⁻¹ 的 LPS 对同窝阴性对照 (WT) 小鼠进行气管内滴注, *Irf8* KO-ALI 组采用 10 mg · kg⁻¹ 的 LPS 对 *Irf8* 敲除 (*Irf8* KO) 小鼠进行气管内滴注; WT-Sham 组采用等体积的 0.9% 氯化钠溶液对同窝阴性对照 (WT) 小鼠进行气管内滴注, *Irf8* KO-Sham 组采用等体积的 0.9% 氯化钠溶液对 *Irf8* 敲除 (*Irf8* KO) 小鼠进行气管内滴注。

1.2.2 细胞培养、模型构建与分组

将 A549 细胞培养在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。该细胞系使用前已鉴定并无支原体污染。ALI 细胞模型是利用 20 μg · mL⁻¹ 的 LPS 刺激 A549 细胞 12 h 后建立, 对照组则利用等体积的 PBS 处理 12 h 后建立。

细胞实验分组主要包括敲低 *IRF8* 和过表达 *IRF8* 两组。敲低 *IRF8* 实验分为 shRNA-PBS 组、sh*IRF8*-PBS 组、shRNA-LPS 组和 sh*IRF8*-LPS 组 4 组, 其中 shRNA-PBS 组和 sh*IRF8*-PBS 组采用等体积 PBS 分别处理 shRNA 和 sh*IRF8* A549 细胞, shRNA-LPS 组和 sh*IRF8*-LPS 组采用 20 μg · mL⁻¹ 的 LPS 分别处理 shRNA 和 sh*IRF8* A549 细胞。过表达 *IRF8* 实验分为 GFP-PBS 组、*IRF8* OE-PBS 组、GFP-LPS 组和 *IRF8* OE-LPS 组 4 组, 其中 GFP-PBS 组和 *IRF8* OE-PBS 组采用等体积 PBS 分别处理 GFP 和 *IRF8* OE A549 细胞, GFP-LPS 组和 *IRF8* OE-LPS 组采用 20 μg · mL⁻¹ 的 LPS 分别处理 GFP 和 *IRF8* OE A549 细胞。

1.2.3 质粒构建和转染

从人源的 cDNA 中扩增人源 *IRF8* 的全长编码序列, 并连接到噬菌载体中构建人 *IRF8* 的过表达质粒。通过将 *IRF8* 的 shRNA 靶序列插入 pLKO.1 慢病毒载体中构建人 *IRF8* 的敲低质

粒。所有质粒均通过 DNA 测序验证。本实验的转染方法是使用聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 将质粒转染到 A549 细胞中。*IRF8* OE-F: 5' -GCAGAGCTCGTTTTAGTGA-3'; *IRF8* OE-R: 5' -CTGGACCACCTCATCCCGT-3'; *shIRF8*-F: 5' -CCGGACCGGTCCCAACTGGACATTTCTCGAGAAATGTCCAGTTGGGACCGGTTTTTG-3'; *shIRF8*-R: 5' -AATTCAAAAAACC GTCCCAACTGGACATTTCTCGAGAAATGTCCAGTTGGGACCGGT-3'。

1.2.4 细胞系构建

将构建好的目的基因质粒和慢病毒包装质粒 (pMD2.G 和 psPAX2) 利用 PEI 共同转染入 HEK293T 细胞, 转染后 6~12 h 换液, 等待 48 h 或 72 h 后收集慢病毒。随后将包装成功的慢病毒感染 A549 细胞, 感染 48~72 h 后, 根据感染效率进行嘌呤霉素的筛选。筛选后的细胞进行不断扩增, 利用蛋白免疫印迹 (western blots, WB) 进行检测是否构建成功, 最终得到稳定表达的 A549 细胞系。

1.2.5 RT-qPCR 实验

提取小鼠肺组织或者 A549 细胞中的 RNA, 利用反转录试剂盒反转为 cDNA。加入 SYBR Green PCR Master Mix 进行聚合酶链式反应。其中所有基因 mRNA 的表达均以 GAPDH 为内参。人源 *IRF8* 上游引物 5' -CGAGGTACGCTGTGCTTTG-3', 下游引物为 5' -CACCAGTCTGGAAGGAGCTG-3'; 人源 *IL-1 β* 上游引物 5' -TTCGACACATGGGATAACGAGG-3', 下游引物为 5' -TTTTGCTGTGAGTCCCGGAG-3'; 人源 *IL-6* 上游引物 5' -GAGTAGTGAGGAAC AAGCCAGA-3', 下游引物为 5' -AAGCTGCGC AGAATGAGATGA-3'; 人源 *TNF α* 上游引物 5' -TGGCGTGGAGCTGAGAGATA-3', 下游引物为 5' -TGATGGCAGAGAGGAGTTG-3'; 人源 *CCL2* 上游引物 5' -AGCAGCAAGTGTCC CAAAGA-3', 下游引物为 5' -TTGGGTTTGT TGTCCAGGT-3'; 人源 *CXCL2* 上游引物 5' -CTTGCCAGCTCTCCTCCTC-3', 下游引物为 5' -AGGGGCGCTCCTGCT-3'; 人源 *CXCL3* 上游引物 5' -CAAACCGAAGTCATAGCCACAC-3', 下游引物为 5' -ACCCTGCAGGAAGTGTCAATG-3'; 人源 *GAPDH* 上游引物 5' -GGAGCGAGATC CCTCCAAAAT-3', 下游引物为 5' -GGCTGTTGTC

ATACTTCTCATGG-3'; 鼠源 *Irf8* 上游引物 5' -CTGCAGCAATTCTACGCCAC-3', 下游引物为 5' -AAGGGTCTCTGGTGTGAGGT-3'; 鼠源 *Il-1 β* 上游引物 5' -CCGTGGACCTTCCAGG ATGA-3', 下游引物为 5' -GGGAACGTCACACACC AGCA-3'; 鼠源 *Il-6* 上游引物 5' -AGTTGCC TTCTTGGGACTGA-3', 下游引物为 5' -TCCACG ATTTCCCAGAGAAC-3'; 鼠源 *Tnfa* 上游引物 5' -CATCTTCTCAAAAATTCGAGTGACAA-3', 下游引物为 5' -TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'; 鼠源 *Ccl2* 上游引物 5' -TAAAAACCTGGATCG GAACCAAA-3', 下游引物为 5' -GCATTAGCT TCAGATTTACGGGT-3'; 鼠源 *Cxcl2* 上游引物 5' -CCAACCACCAGGCTACAGG-3', 下游引物为 5' -GCGTCACACTCAAGCTCTG-3'; 鼠源 *Cxcl3* 上游引物 5' -TGAGACCATCCAGAGCTTGAC-3', 下游引物为 5' -TTCATCATGGTGAAGGGCTTC-3'; 鼠源 *Gapdh* 上游引物 5' -AGGTCGGTGTGAACG GATTTG-3', 下游引物为 5' -GGGTCGTTG ATGGCAACA-3'。

1.2.6 蛋白免疫印迹检测蛋白表达水平

将取材得到的肺组织或者处理好的 A549 细胞使用 RIPA 裂解缓冲液提取其中的蛋白质。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定细胞或组织裂解物中的蛋白质浓度并制定蛋白样品。将蛋白样品在 8%~12% SDS-PAGE 凝胶上分离并转移到 PVDF 膜上。采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 分别使用一抗 (BAX、BAD、p-BAD、BCL₂、*IRF8*、SLC7A11、GPX4 和 GAPDH) 和二抗进行孵育。洗膜后, 使用 ChemiDoc MP 成像系统获取图像。以 GAPDH 为内参。

1.2.7 免疫荧光

将载玻片上的切片与一抗在 4 °C 下孵育过夜, 然后与 HRP 偶联的二抗孵育 1 h, 采用 DAB 染色观察阳性细胞。通过评估至少 4 个随机选择的高倍视野来量化每只小鼠肺组织中炎症细胞浸润程度, 阳性率表示阳性染色细胞占总细胞计数的比例。使用 Image-J2 进行图片处理和分析。

1.2.8 HE 染色评价肺损伤情况

取固定后肺组织, 石蜡包埋后连续切片, 厚度为 5 μ m, 进行 HE 染色, 光镜下观察肺组织组织病理学变化, 利用 Smith 评分方法对肺损伤程度进行评分和半定量分析。

1.2.9 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP 缺口末端标记

进行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL), 将取材获得的肺组织经过固定、包埋和切片, 按照试剂盒说明书进行染色, 通过选取多个高倍镜视野来定量。使用 Image J2 进行图片处理和分析。

1.2.10 肺泡灌洗液检测

将经过生理盐水灌洗后的肺组织取材, 称重得到湿重; 放入烘箱 72 h 后再次称重得到干重。用生理盐水反复灌洗肺组织 3 次后得到的液体为肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 采用 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后得到沉淀, 利用血细胞计数仪测定 BALF 总细胞计数, 所得上清利用 BCA 检测试剂盒测定 BALF 中总的蛋白浓度。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 29.0 软件进行数据分析, 本研究所有的数据均采用平均数与标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体内外ALI模型中IRF8的表达情况

本实验分别在体内外 ALI 模型中检测 *IRF8* 的蛋白和 mRNA 表达情况。实验结果发现, 与 PBS 组相比, LPS 刺激后 A549 细胞中 *IRF8* 的蛋白和 mRNA 均表达上调, 差异具有统计学意义

($P < 0.05$) (图 1-A、1-B); 小鼠 ALI 模型实验结果与体外实验结果基本一致 (图 1-C、1-D)。基于上述实验结果推测 *IRF8* 可能参与了 ALI 的发生发展。

2.2 体外敲低IRF8进一步加剧细胞内炎症和细胞凋亡

为了进一步探索 *IRF8* 在 ALI 中扮演的具体角色, 本研究在体外构建了稳定表达敲低 *IRF8* 的 A549 细胞系, 结果通过 WB 检测得到了验证 (图 2-A)。进一步的 RT-qPCR 结果发现, 与 shRNA-LPS 组相比较, sh*IRF8*-LPS 组炎症相关因子 mRNA 水平进一步增加 (图 2-B)。此外, 在 LPS 处理条件下敲低 *IRF8* 进一步促进了促凋亡相关基因 (BAX、p-BAD) 的表达, 而抗凋亡相关基因 (BCL₂) 则表达减少 (图 2-C)。上述实验结果共同证实体外敲低 *IRF8* 可进一步加重肺泡 II 型上皮细胞内炎症和凋亡。

2.3 体外过表达IRF8在肺泡II型上皮细胞中发挥保护作用

为了双重验证 *IRF8* 在 ALI 中的生物学功能, 本实验成功构建了稳定过表达 *IRF8* 的 A549 细胞系, 并通过 WB 检测得到验证 (图 3-A)。实验结果发现, 与 GFP-LPS 组相比, *IRF8* OE-LPS 组炎症相关因子的转录水平明显下调 (图 3-B)。同时本研究检测了凋亡相关基因的蛋白水平表达, 实验结果发现 *IRF8* OE-LPS 组较 GFP-LPS 组促凋亡相关基因 (BAX、p-PAD) 表达下调, 而抑凋亡相关基因 (BCL₂) 表达上调 (图 3-C)。因此, 体外过表达 *IRF8* 在肺泡 II 型上皮细胞中发挥重要保护作用。

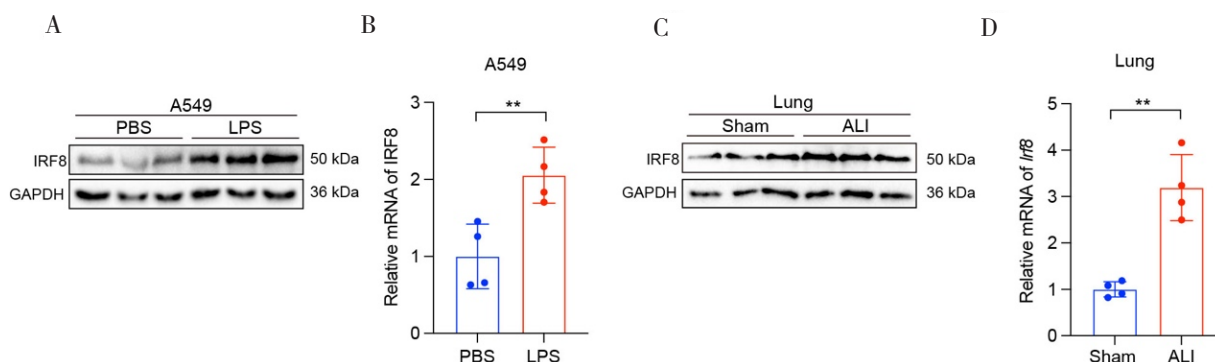


图1 体内外ALI模型中IRF8的表达情况

Figure 1. The expression of *IRF8* in both *in vivo* and *in vitro* model of ALI

注: A.PBS和LPS组A549细胞中*IRF8*蛋白表达情况 ($n=3$ 次独立重复实验); B.PBS和LPS组A549细胞中*IRF8* mRNA表达情况 ($n=4$ 次独立重复实验); C.Sham组和ALI组肺组织中*IRF8*蛋白水平表达的免疫印迹代表图 ($n=4$); D.Sham组和ALI组肺组织中*IRF8*转录水平表达情况 ($n=4$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

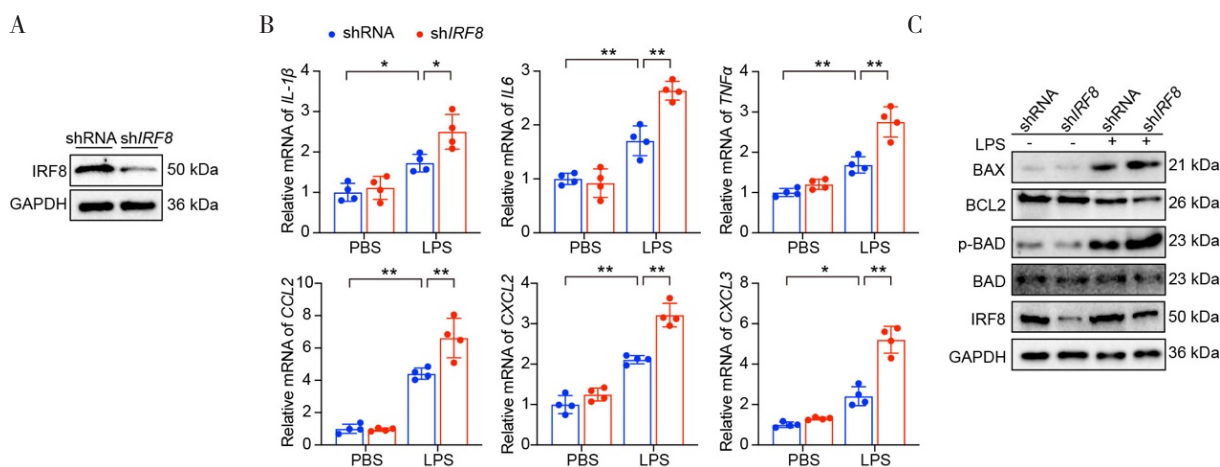


图2 体外敲低 $IRF8$ 对细胞内炎症反应和凋亡的影响

Figure 2. The effect of $IRF8$ knockdown on intracellular inflammatory response and apoptosis *in vitro*

注: A.敲低 $IRF8$ 稳定转染细胞系的鉴定结果 ($n=3$ 次独立重复实验); B.检测炎症相关因子的mRNA表达水平 ($n=4$ 次独立重复实验); C.检测凋亡相关基因的蛋白表达水平 ($n=3$ 次独立重复实验); * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

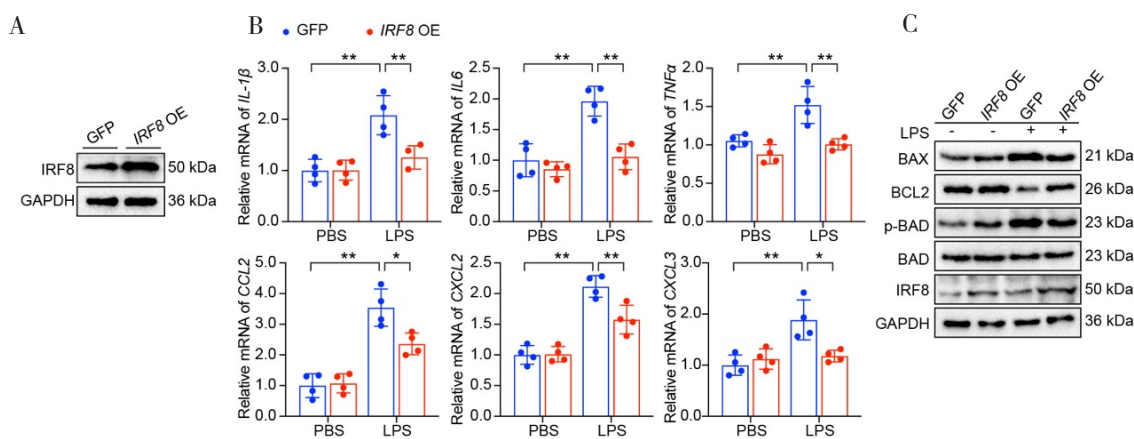


图3 体外过表达 $IRF8$ 对细胞内炎症反应和凋亡的影响

Figure 3. The effect of overexpression $IRF8$ on intracellular inflammatory response and apoptosis *in vitro*

注: A.过表达 $IRF8$ 稳定转染细胞系的鉴定结果 ($n=3$ 次独立重复实验); B.检测炎症相关因子的mRNA表达水平 ($n=4$ 次独立重复实验); C.检测凋亡相关基因的蛋白表达水平 ($n=3$ 次独立重复实验); * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.4 敲除 $Irf8$ 进一步加重小鼠肺组织损伤

本实验构建 $Irf8$ 敲除品系小鼠, 通过体内实验进一步验证该分子在 ALI 中的生物学功能 (图 4-A)。与 WT-ALI 组相比, $Irf8$ KO-ALI 组小鼠 BALF 总细胞数和上清中总蛋白质浓度均显著增加 (图 4-B、图 4-C)。组织学分析结果发现 $Irf8$ KO-ALI 组小鼠肺损伤病理评分较 WT-ALI 组增加, 并且通过 HE 染色代表图像发现 $Irf8$ KO-ALI 组小鼠肺组织炎症浸润程度和肺间质出血相较于 WT-ALI 组明显加重 (图 4-D、图 4-E)。此外, 本研究对肺组织中的炎症细胞进行免疫荧

光染色分析, 结果发现 $Irf8$ KO-ALI 组 $CD11b^+$ 和 $Ly6G^+$ 细胞比率相较 WT-ALI 组均显著增加 (图 4-F、图 4-G)。进一步的 RT-qPCR 结果也发现, 敲除 $Irf8$ 将进一步加重小鼠肺组织中炎性细胞浸润程度 (图 4-H)。另一方面, TUNEL 染色以及凋亡相关基因蛋白表达水平检测结果显示, $Irf8$ 的敲除进一步加重了小鼠肺组织内凋亡和损伤程度 (图 4-I、4-J)。上述实验结果均证实敲除 $Irf8$ 可进一步引发组织内炎症反应级联放大和小鼠肺组织损伤。

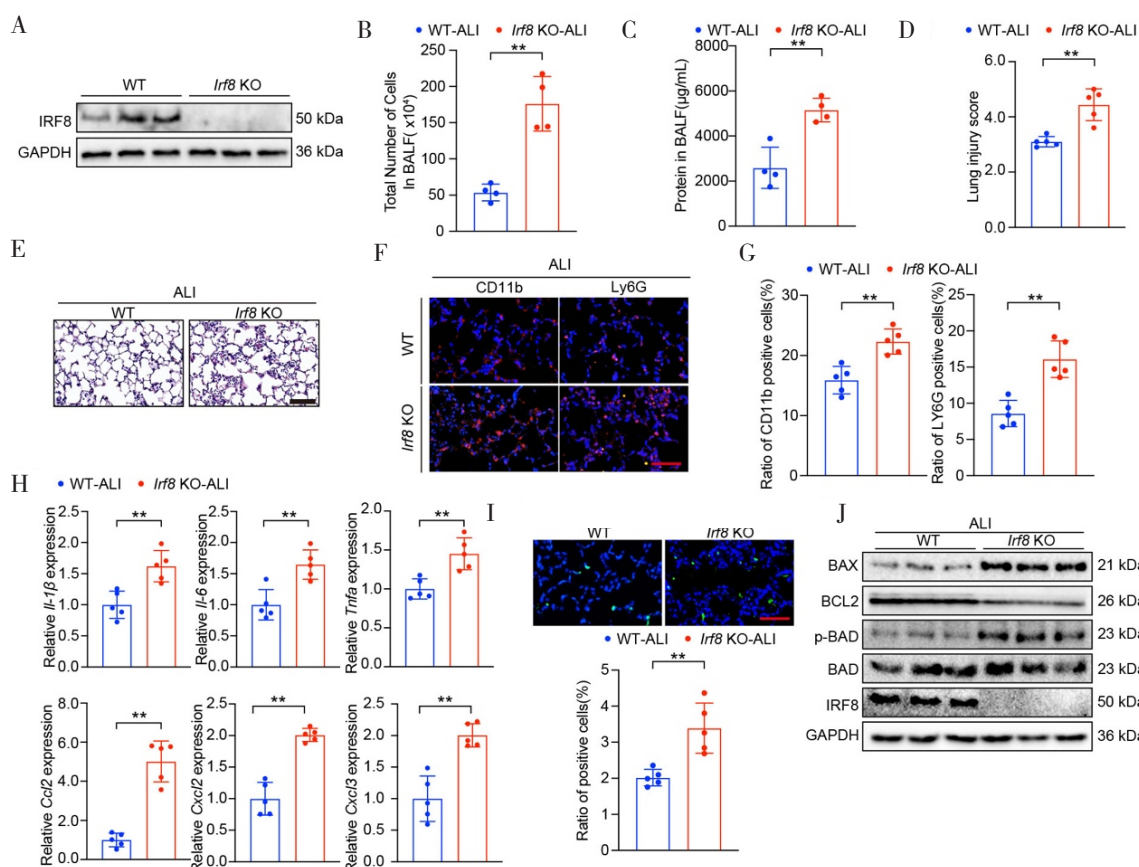


图4 敲除Irf8对小鼠肺组织中炎症和凋亡情况的影响

Figure 4. The impact of *Irf8* knockout on inflammation and apoptosis in mice lung tissue

注: A. *Irf8*敲除品系小鼠鉴定的免疫印迹代表图 ($n=5$); B. BALF中总细胞数的检测 ($n=4$); C. BALF中上清总蛋白浓度的检测 ($n=4$); D. 肺损伤病理评分半定量分析 ($n=5$); E. 病理情况下肺组织HE染色代表图像 ($\times 200$ 倍) ($n=5$), 标尺: 50 μm ; F. 肺组织中CD11b和Ly6G免疫荧光染色代表图像 ($\times 200$ 倍) ($n=5$), 标尺: 25 μm ; G. 肺组织中CD11b和Ly6G免疫荧光染色定量结果 ($n=5$); H. 检测炎症相关因子mRNA的表达水平 ($n=5$); I. TUNEL染色代表图像 (上) 和定量分析结果 (下) ($n=5$), 标尺: 25 μm ; J. 凋亡相关基因蛋白表达水平的检测; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.5 IRF8对铁死亡相关信号分子SLC7A11/GPX4的表达影响

为了探索 *IRF8* 是否通过铁死亡来调节 ALI 的疾病进程, 本实验分别在体内外 ALI 模型中检测了 *IRF8* 对铁死亡相关信号分子 SLC7A11/GPX4 蛋白表达水平的影响。实验结果发现, 与 WT 组相比, *Irf8* 敲除小鼠肺组织中 SLC7A11 和 GPX4

蛋白水平表达下调 (图 5-A)。同时在 A549 细胞中发现敲低或过表达 *IRF8* 在 LPS 刺激条件下与 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平变化一致 (图 5-B、5-C)。实验结果验证了 *IRF8* 通过影响铁死亡相关信号分子 SLC7A11/GPX4 的表达进而影响 ALI 疾病进程, 进一步拓展 ALI 的发病机制并寻找有效治疗靶点。

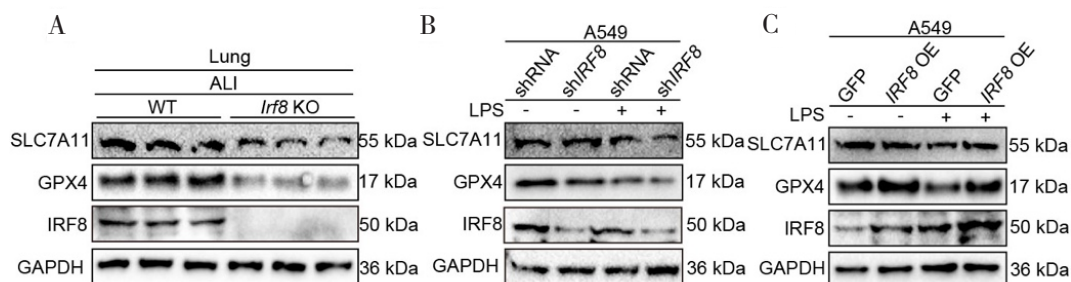


图5 IRF8对铁死亡相关信号分子SLC7A11/GPX4的表达影响

Figure 5. The impact of *IRF8* on the expression of ferroptosis-related signaling molecules SLC7A11/GPX4

注: A. *Irf8*敲低小鼠肺组织中SLC7A11和GPX4蛋白表达水平的免疫印迹代表图 ($n=5$); B. 检测稳定转染IRF8敲低的A549细胞系中SLC7A11和GPX4蛋白的表达水平 ($n=3$ 次独立重复实验); C. 检测稳定转染IRF8过表达的A549细胞系中SLC7A11和GPX4蛋白的表达水平 ($n=3$ 次独立重复实验)。

3 讨论

ALI/ARDS 由于发病机制复杂、死亡率高,已成为现代危重医学亟待解决的一大难题。肺部炎症反应级联放大和肺泡上皮细胞损伤是 ALI/ARDS 的重要病理生理特征,这些病理过程与氧化应激、细胞凋亡以及炎症反应等事件密切相关^[13]。目前对于 ALI/ARDS 患者以支持治疗(如机械通气、体外膜肺氧合等)为主,虽可以改善症状,但是患者长期预后差和死亡率高问题依旧存在^[14],因此寻找治疗 ALI/ARDS 的关键调节分子迫在眉睫。

病原相关分子模式或损伤相关分子模式等直接或间接损伤因素可激活 IRFs,并进一步参与自身免疫系统疾病的发展^[15]。其中 *IRF8* 是一个表达受 IFN- γ 调控的级联因子,在维持免疫细胞稳态和周转中起关键作用^[16]。最近研究表明 *IRF8* 参与调节 NLR 家族凋亡抑制蛋白的转录,进而促进核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 4 炎症小体的形成,最终引发宿主对细菌和其他微生物病原体的防御反应^[17]。*IRF8* 在天然免疫过程中和其他病理状态下发挥重要调节作用^[16,18]。在肺部疾病中,天然免疫可帮助机体对抗感染并维持肺部组织的稳态。既往研究表明 *IRF8* 在巨噬细胞的发育和功能中发挥重要调节作用,同时 *IRF8* 可通过调控炎症介质的表达或调节免疫细胞的活性来影响炎症反应的程度和持续时间^[19]。但是在肺损伤中,*IRF8* 扮演的角色尚不清楚。本研究专注于肺泡上皮细胞损伤的研究,实验结果显示 *IRF8* 不仅能显著改善肺组织的结构和功能,还可减轻肺泡上皮细胞内炎症和凋亡。这些实验结果共同证实 *IRF8* 在 ALI 中的重要调节作用。

铁死亡是一种非凋亡性的死亡方式,通常伴有大量的铁积累和脂质过氧化。大量研究报道铁死亡发生的潜在机制主要与谷胱甘肽耗竭、GPX4 失活、铁超载、脂质过氧化物和活性氧相关^[20]。然而大量积累的活性氧和脂质过氧化物可进一步加重细胞内炎症因子级联释放和细胞凋亡,最终导致细胞免疫反应失调、细胞死亡和组织损伤。最近研究证实,铁死亡密切参与 ALI/ARDS 的疾病发展^[12]。因此,铁死亡可以作为 ALI/ARDS 的治疗和干预靶标。

本研究发现,在 ALI 体内外模型中 *IRF8* 蛋

白水平和转录水平表达均明显上调,说明 *IRF8* 可能参与调控 ALI 疾病进程。进一步在体内外实验中分别检测 *IRF8* 对炎症相关因子的表达水平以及细胞凋亡严重程度的影响,结果发现 *IRF8* 可抑制细胞内炎症反应和细胞凋亡,在 ALI 中发挥保护作用。进一步的机制探索发现,*IRF8* 可通过上调 SLC7A11/GPX4 铁死亡相关信号分子表达而减少肺组织损伤。

本研究仍存在一定的局限性。实验仅在细胞系中探讨了 *IRF8* 在 ALI 中的作用和机制,未在原代细胞中进行验证,还需更多的后续实验进行补充和完善。此外,*IRF8* 在 ALI/ARDS 中的机制研究还需深入探讨。

综上所述,本研究发现,*IRF8* 作为一个关键调节因子,通过上调铁死亡相关信号分子 SLC7A11 和 GPX4 的表达,进而减轻肺损伤的进展。这一发现进一步拓展了对 *IRF8* 生物学功能以及 ALI 发病机制的理解。

参考文献

- 1 Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800. DOI: 10.1001/jama.2016.0291.
- 2 Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(4): 345-50. DOI: 10.5858/arpa.2015-0519-RA.
- 3 Grothberg JC, Reynolds D, Kraft BD. Management of severe acute respiratory distress syndrome: a primer[J]. Crit Care, 2023, 27(1): 289. DOI: 10.1186/s13054-023-04572-w.
- 4 彭静,李巧玲,梅艳,等.基于 CiteSpace 的天然药物及中药治疗急性肺损伤机制研究中文文献可视化分析[J].药物流行病学杂志,2023,32(11):1296-1304. [Peng J, Li QL, Mei Y, et al. Visual analysis of Chinese literature on the mechanism of natural drugs and traditional Chinese medicine in the treatment of acute lung injury based on CiteSpace[J]. Chinese Journal of Pharmacoepidemiology, 2023, 32(11): 1296-1304.] DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202311013.
- 5 朱紫陌,赵显芳,崔白梅,等.云南民族药理肺散防治急性肺损伤的作用及网络药理学分析[J].中国药师,2022,25(11):1914-1921. [Zhu ZM, Zhao XF, Cui

- BM, et al. The effect of Yunnan ethnic pharmacology lung powder on the prevention and treatment of acute lung injury and network pharmacology analysis[J]. Chinese Pharmacist, 2022, 25(11): 1914–1921. DOI: [10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.11.008](https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.11.008).
- 6 Chiang HS, Liu HM. The molecular basis of viral inhibition of IRF- and STAT-dependent immune responses[J]. Front Immunol, 2018, 9: 3086. DOI: [10.3389/fimmu.2018.03086](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03086).
- 7 Tamura T, Yanai H, Savitsky D, et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26: 535–584. DOI: [10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400).
- 8 Moorman HR, Reategui Y, Poschel DB, et al. IRF8: mechanism of action and health implications[J]. Cells, 2022, 11(17): 2630. DOI: [10.3390/cells11172630](https://doi.org/10.3390/cells11172630).
- 9 Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues[J]. Cell, 2020, 181(5): 1016–1035. e19. DOI: [10.1016/j.cell.2020.04.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035).
- 10 Poschel DB, Kehinde-Ige M, Klement JD, et al. *IRF8* regulates intrinsic ferroptosis through repressing p53 expression to maintain tumor cell sensitivity to cytotoxic T lymphocytes[J]. Cells, 2023, 12(2): 310. DOI: [10.3390/cells12020310](https://doi.org/10.3390/cells12020310).
- 11 Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(7): 381–396. DOI: [10.1038/s41568-022-00459-0](https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0).
- 12 Wang Y, Zhao Z, Xiao Z. The emerging roles of ferroptosis in pathophysiology and treatment of acute lung injury[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 4073–4085. DOI: [10.2147/jir.S420676](https://doi.org/10.2147/jir.S420676).
- 13 Bezerra FS, Lanzetti M, Nesi RT, et al. Oxidative stress and inflammation in acute and chronic lung injuries[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(3): 548. DOI: [10.3390/antiox12030548](https://doi.org/10.3390/antiox12030548).
- 14 Herridge MS, Azoulay É. Outcomes after critical illness[J]. N Engl J Med, 2023, 388(10): 913–924. DOI: [10.1056/NEJMra2104669](https://doi.org/10.1056/NEJMra2104669).
- 15 Jefferies CA. Regulating IRFs in IFN driven disease[J]. Front Immunol, 2019, 10: 325. DOI: [10.3389/fimmu.2019.00325](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00325).
- 16 Liang KL, Laurenti E, Taghon T. Circulating *IRF8*-expressing CD123⁺ CD127⁺ lymphoid progenitors: key players in human hematopoiesis[J]. Trends Immunol, 2023, 44(9): 678–692. DOI: [10.1016/j.it.2023.07.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2023.07.004).
- 17 Karki R, Lee E, Place D, et al. *IRF8* regulates transcription of naips for NLRC4 inflammasome activation[J]. Cell, 2018, 173(4): 920–933. e13. DOI: [10.1016/j.cell.2018.02.055](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.055).
- 18 Johnson KD, Jung MM, Tran VL, et al. Interferon regulatory factor-8-dependent innate immune alarm senses GATA2 deficiency to alter hematopoietic differentiation and function[J]. Curr Opin Hematol, 2023, 30(4): 117–123. DOI: [10.1097/moh.0000000000000763](https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000763).
- 19 Salem S, Salem D, Gros P. Role of *IRF8* in immune cells functions, protection against infections, and susceptibility to inflammatory diseases[J]. Hum Genet, 2020, 139(6–7): 707–721. DOI: [10.1007/s00439-020-02154-2](https://doi.org/10.1007/s00439-020-02154-2).
- 20 Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266–282. DOI: [10.1038/s41580-020-00324-8](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8).

收稿日期: 2024 年 02 月 22 日 修回日期: 2024 年 03 月 25 日
本文编辑: 桂裕亮 曹越

引用本文: 王佳, 李忻炎, 李琳钰, 等. *IRF8*靶向铁死亡在急性肺损伤中的作用及机制研究[J]. 医学新知, 2024, 34(4): 363–371. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202403082](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202403082)
Wang J, Li XY, Li YL, et al. Role and mechanism of *IRF8* targeting ferroptosis in the pathogenesis of acute lung injury[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2024, 34(4): 363–371. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202403082](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202403082)