

· 论著 ·

本文亮点:

- (1) 证实 Krüppel 样因子 4(KLF4) 在 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应中表达显著下降, 显著抑制巨噬细胞炎症反应。
- (2) 证实 KLF4 可显著提高脓毒症小鼠生存率并缓解炎症反应与脓毒症相关脏器损伤, 为探索采用 KLF4 治疗脓毒症提供新的理论依据。



Krüppel 样因子 4 对脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤的作用

王运帷¹ 刘洋¹ 曹鹏¹ 张清怡² 陈阳¹ 李少琿¹ 官浩¹

¹空军军医大学第一附属医院烧伤与皮肤外科, 全军烧伤中心, 西安 710032; ²空军军医大学基础医学院学员三大队, 西安 710032

通信作者: 官浩, Email: guanhao@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨 Krüppel 样因子 4(KLF4) 在巨噬细胞炎症反应中的表达特点与作用及其对脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤的作用, 为烧伤创脓毒症的靶向治疗奠定理论基础。方法 采用实验研究方法。取小鼠 RAW264.7 巨噬细胞与从 10 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠中提取的原代腹腔巨噬细胞(PM)进行实验。采用内毒素/脂多糖(LPS)分别处理 RAW264.7 巨噬细胞与 PM 0(未处理)、1、2、4、6、8、12、24 h 构建巨噬细胞炎症反应模型, 采用实时荧光定量反转录 PCR(RT-PCR)法检测白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、CC 趋化因子配体 2(CCL2)与肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 表达, 据此确定后续部分实验 LPS 处理时间。用 LPS 处理 RAW264.7 巨噬细胞 0、8 h, 采用免疫荧光法检测 KLF4 的定位与蛋白表达; 利用高通量测序技术平台对细胞进行转录组测序, 采用 DESeq2 软件筛选 2 种处理时间细胞间的差异表达基因(DEG)。采用 LPS 分别处理 RAW264.7 巨噬细胞与 PM 0、1、2、4、6、8、12、24 h, 分别用实时荧光定量 RT-PCR 法与蛋白质印迹法检测 KLF4 的 mRNA 与蛋白表达。将 RAW264.7 巨噬细胞按随机数字表法分为阴性对照组与 KLF4 过表达组, 分别转染对应质粒后用 LPS 处理 0、8 h, 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 KLF4、IL-1 β 、IL-6、CCL2 与 TNF- α 的 mRNA 表达, 采用蛋白质印迹法检测 KLF4 蛋白表达。前述实验样本数均为 3。将 40 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为 KLF4 过表达组和阴性对照组(每组 20 只), 分别注射相应转染注射液后构建盲肠结扎穿孔脓毒症模型。采用随机数字表法从 2 组小鼠中各选取 12 只, 观察建模后 72 h 内生存情况。于建模后 8 h 取 2 组分别剩余的 8 只小鼠, 先行眼球取血, 采用酶联免疫吸附测定法检测血清中 IL-1 β 、IL-6 水平, 采用干化学法检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平; 后取心脏、肺脏、肝脏组织, 行苏木精-伊红染色后观察损伤情况。对数据行独立样本 *t* 检验、Cochran&Cox 近似 *t* 检验、单因素方差分析、Dunnett 检验、Brown-Forsythe 和 Welch 单因素方差分析、Dunnett T3 检验、log-rank(Mantel-Cox)检验。结果 与 LPS 处理 0 h 比较, LPS 处理 6 h 与 8 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β mRNA 表达、LPS 处理 4~12 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-6 mRNA 表达、LPS 处理 8 h 和 12 h RAW264.7 巨噬细胞中 CCL2 mRNA 表达以及 LPS 处理 4~8 h RAW264.7 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LPS 处理 4~8 h PM 中 IL-1 β 与 CCL2 mRNA 表达、LPS 处理 2~24 h PM 中 IL-6 mRNA 表达以及 LPS 处理 2~12 h PM 中 TNF- α mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

DOI: 10.3760/ema.j.cn501225-20220111-00005

本文引用格式: 王运帷, 刘洋, 曹鹏, 等. Krüppel 样因子 4 对脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤的作用[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(11): 1047-1056. DOI: 10.3760/ema.j.cn501225-20220111-00005.

Wang YW, Liu Y, Cao P, et al. Effects of Krüppel-like factor 4 on inflammatory response and organ injury in septic mice[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(11): 1047-1056. DOI: 10.3760/ema.j.cn501225-20220111-00005.



选取 8 h 作为后续部分实验的 LPS 处理时间。KLF4 主要定位在 RAW264.7 巨噬细胞的细胞核中。与 LPS 处理 0 h 比较, LPS 处理 8 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 蛋白表达明显减少; LPS 处理 8 h RAW264.7 巨噬细胞中有 1 470 个差异表达显著的 DEG, 包括转录表达显著下调的 *KLF4* [错误发现率 < 0.05, \log_2 (差异倍数) = -2.47]。与 LPS 处理 0 h 比较, LPS 处理 6~24 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 mRNA 表达、LPS 处理 1~24 h RAW264.7 巨噬细胞与 PM 中 KLF4 蛋白表达以及 LPS 处理 4~24 h PM 中 KLF4 的 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与阴性对照组比较, KLF4 过表达组 LPS 处理 0、8 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的 mRNA (t 值分别为 17.03、8.61, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 与蛋白表达均明显升高, LPS 处理 0 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-6、CCL2 的 mRNA 表达均明显升高 (t 值分别为 6.29、3.40, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LPS 处理 8 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6、CCL2、TNF- α 的 mRNA 表达均显著下降 (t 值分别为 10.52、9.60、4.58、8.58, $P < 0.01$)。KLF4 过表达组小鼠建模后 72 h 内生存比例明显高于阴性对照组 ($\chi^2 = 4.01$, $P < 0.05$)。建模后 8 h, KLF4 过表达组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 与 ALT、AST 水平分别为 (161 \pm 63)、(476 \pm 161) pg/mL 与 (144 \pm 24)、(264 \pm 93) U/L, 明显低于阴性对照组的 (257 \pm 58)、(654 \pm 129) pg/mL 与 (196 \pm 27)、(407 \pm 84) U/L (t 值分别为 3.16、2.44 与 4.04、3.24, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。建模后 8 h, 与阴性对照组比较, KLF4 过表达组小鼠心脏、肺脏、肝脏的组织结构紊乱减轻, 炎性渗出明显减少, 脏器实质细胞病理样改变明显减轻。

结论 KLF4 在 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应中表达显著下降, 显著抑制巨噬细胞炎症反应; KLF4 显著提高脓毒症小鼠生存率并缓解炎症反应与脓毒症相关脏器损伤。

【关键词】 脓毒症; 巨噬细胞; Kruppel 样转录因子类; 内毒素类; 炎症反应; 脏器损伤

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81501666); 陕西省自然科学基金面上项目 (2021JM-249)

Effects of Krüppel-like factor 4 on inflammatory response and organ injury in septic mice

Wang Yunwei¹, Liu Yang¹, Cao Peng¹, Zhang Qingyi², Chen Yang¹, Li Shaohui¹, Guan Hao¹

¹Department of Burns and Cutaneous Surgery, Burn Center of PLA, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²Department of the Third Student Battalion, School of Basic Medical Sciences of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Guan Hao, Email: guanhao@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the expression characteristics and role of Krüppel-like factor 4 (KLF4) in macrophage inflammatory response and its effects on inflammatory response and organ injury in septic mice, so as to lay a theoretical foundation for targeted treatment of burns and trauma sepsis. **Methods** The method of experimental research was used. Mouse RAW264.7 macrophages and primary peritoneal macrophages (PMs) isolated from 10 male C57BL/6J mice aged 6–8 weeks were used for the experiments. RAW264.7 macrophages and PMs were treated with endotoxin/lipopolysaccharide (LPS) for 0 (without treatment), 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h, respectively, to establish macrophage inflammatory response model. The mRNA expression of interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6, CC chemokine ligand 2 (CCL2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the LPS treatment time was determined for some of the subsequent experiments. RAW264.7 macrophages were treated with LPS for 0 and 8 h, the localization and protein expression of KLF4 were detected by immunofluorescence method, transcriptome sequencing of the cells was performed using the high-throughput sequencing technology platform, and the differently expressed genes (DEGs) between the two time points treated cells were screened by DESeq2 software. RAW264.7 macrophages and PMs were treated with LPS for 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h, respectively, and the mRNA and protein expressions of KLF4 were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. RAW264.7 macrophages were divided into negative control (NC) group and KLF4-overexpression group according to the random number table, which were treated with LPS for 0 and 8 h respectively after transfection of corresponding plasmid. The mRNA expressions of KLF4, IL-1 β , IL-6, CCL2, and TNF- α were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR, while the protein expression of KLF4 was detected by Western blotting. The number of samples in aforementioned experiments was all 3. Forty male C57BL/6J mice aged 6–8 weeks were divided into KLF4-overexpression group and NC group (with 20 mice in each group) according to the random number table, and the sepsis model of cecal ligation perforation was established after the corresponding transfection injection was injected respectively. Twelve mice were selected from each of the two groups according to the random number table, and the survival status within 72 hours after modeling was observed. Eight hours after modeling, the

remaining 8 mice in each of the two groups were selected, the eyeball blood samples were collected to detect the levels of IL-1 β and IL-6 in serum by enzyme-linked immunosorbent assay, and the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum by dry chemical method. Subsequently, the heart, lung, and liver tissue was collected, and the injury was observed after hematoxylin-eosin staining. Data were statistically analyzed with independent sample *t* test, Cochran & Cox approximate *t* test, one-way analysis of variance, Dunnett test, Brown-Forsythe and Welch one-way analysis of variance, Dunnett T3 test, log-rank (Mantel-Cox) test. **Results** Compared with that of LPS treatment for 0 h, the mRNA expressions of IL-1 β in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 6 h and 8 h, the mRNA expressions of IL-6 in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 4–12 h, the mRNA expressions of CCL2 in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 8 h and 12 h, and the mRNA expressions of TNF- α in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 4–8 h were significantly up-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the mRNA expressions of IL-1 β and CCL2 in PMs treated with LPS for 4–8 h, the mRNA expressions of IL-6 in PMs treated with LPS for 2–24 h, and the mRNA expressions of TNF- α in PMs treated with LPS for 2–12 h were significantly up-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). Eight hours was selected as the LPS treatment time for some of the subsequent experiments. KLF4 mainly located in the nucleus of RAW264.7 macrophages. Compared with those of LPS treatment for 0 h, the protein expression of KLF4 in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 8 h was obviously decreased, and there were 1 470 statistically differentially expressed DEGs in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 8 h, including KLF4 with significantly down-regulated transcriptional expression (false discovery rate <0.05 , \log_2 (fold change)=-2.47). Compared with those of LPS treatment for 0 h, the mRNA expressions of KLF4 in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 6–24 h, the protein expressions of KLF4 in RAW264.7 macrophages and PMs treated with LPS for 1–24 h, and the mRNA expressions of KLF4 in PM treated with LPS for 4–24 h were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with those in NC group, the mRNA (with *t*' values of 17.03 and 8.61, respectively, $P<0.05$ or $P<0.01$) and protein expressions of KLF4 in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 0 h and 8 h in KLF4-overexpression group were significantly increased, the mRNA expressions of IL-6 and CCL2 increased significantly in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 0 h (with *t* values of 6.29 and 3.40, respectively, $P<0.05$ or $P<0.01$), while the mRNA expressions of IL-1 β , IL-6, CCL2, and TNF- α decreased significantly in RAW264.7 macrophages treated with LPS for 8 h (with *t* values of 10.52, 9.60, 4.58, and 8.58, respectively, $P<0.01$). The survival proportion of mice within 72 h after modeling in KLF4-overexpression group was significantly higher than that in NC group ($\chi^2=4.01$, $P<0.05$). Eight hours after modeling, the serum levels of IL-1 β , IL-6 and ALT, AST of mice in KLF4-overexpression group were (161 \pm 63), (476 \pm 161) pg/mL and (144 \pm 24), (264 \pm 93) U/L, respectively, which were significantly lower than (257 \pm 58), (654 \pm 129) pg/mL and (196 \pm 27), (407 \pm 84) U/L (with *t* values of 3.16, 2.44 and 4.04, 3.24, respectively, $P<0.05$ or $P<0.01$) in NC group. Eight hours after modeling, compared with those in NC group, the disorder of tissue structure of heart, lung, and liver, inflammatory exudation, and pathological changes of organ parenchyma cells in KLF4-overexpression group were obviously alleviated. **Conclusions** The expression of KLF4 is significantly down-regulated in LPS-induced macrophage inflammatory response, which significantly inhibits the macrophage inflammatory response. KLF4 significantly enhances the survival rate of septic mice and alleviates inflammatory response and sepsis-related organ injury.

【 Key words 】 Sepsis; Macrophages; Kruppel-like transcription factors; Endotoxins; Inflammatory response; Organ injury

Fund program: Youth Science Fund of National Natural Science Foundation of China (81501666); General Program of Natural Science Foundation of Shaanxi Province of China (2021JM-249)

脓毒症是由严重烧创伤、感染等因素诱发的 SIRS,其病情发展迅速,致死率达 14.7%~29.9%^[1],主要致死因素为过度的炎症反应引发的 MODS^[2]。在脓毒症失控性炎症反应中,巨噬细胞既是启动细胞也是效应细胞。感染等因素刺激机体时,巨噬细胞过度活化,大量分泌细胞因子与炎症介质,引起炎症的瀑布性级联放大反应,进而诱发全身性的免疫紊乱^[3]。因此,控制巨噬细胞过度活化是遏制脓毒症发生发展的重要环节。

Krüppel 样因子 4(KLF4)是一种进化保守的含锌指蛋白的核转录因子,主要通过激活或抑制下游基因的转录而发挥其生物学功能,参与调节细胞增殖、迁移、凋亡、自噬等生物学过程^[4-5]。研究表明,KLF4在巨噬细胞极化和先天免疫调节中发挥重要作用,可直接调控多种炎症因子,如 IL-4^[6]、IL-6^[7]、高迁移率族蛋白 B1^[8]等。然而,KLF4能否参与脓毒症小鼠巨噬细胞炎症反应及对脓毒症小鼠相关脏器损伤是否有调节作用尚不明确。因此,本研究采

用 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应模型,旨在明确 KLF4 在巨噬细胞炎症反应中的表达特点与作用,另观察 KLF4 在脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤中的效应,为探索采用 KLF4 治疗脓毒症提供新的理论依据。

1 材料与方 法

本实验研究遵循空军军医大学动物实验伦理委员会和国家有关动物实验管理和使用的规定。

1.1 细胞和动物及主要试剂与仪器来源

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购自美国模式培养物集存库。50 只 6~8 周龄体重 18~22 g 雄性健康无特殊病原体级 C57BL/6J 小鼠购自空军军医大学动物实验中心,许可证号:SCXK(陕)2019-001。LPS 购自美国 Sigma 公司,胎牛血清购于上海吉泰依科赛生物科技有限公司,兔抗小鼠 KLF4 单克隆抗体、兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体购于美国 Proteintech 公司,Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体购于英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体、IL-1 β 与 IL-6 的 ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,mRNA 检测配套试剂盒购于日本 Takara 公司,HE 染色试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司,ALT、AST 干化学法特异试剂盒购于南京建成生物工程研究所,KLF4 过表达质粒 GV358、空载质粒及转染配套试剂购于上海吉凯基因科技有限公司。IQ5 型实时荧光定量 PCR 仪、Mini 型蛋白电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司,FSX100 型生物导航仪购自日本 Olympus 公司,Alpha-ImagerTM2200 型凝胶图像分析系统购自美国 Alpha Innotech 公司。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞 (PM) 的分离培养与 RAW264.7 巨噬细胞的培养

采用 Bain 和 Jenkins^[9] 的方法,提取 10 只小鼠 PM。将提取的原代 PM 接种于 6 孔板中,用含有体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、含体积分数 5% 二氧化碳培养箱中培养(培养条件下同),细胞贴壁后换液,次日开始进行后续实验。将小鼠 RAW264.7 巨噬细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,后续处理同 PM。后续细胞实验中样本数均为 3。

1.3 巨噬细胞炎症反应模型的构建与促炎因子 mRNA 表达检测

取 RAW264.7 巨噬细胞与 PM,均采用质量浓度

为 1 μ g/mL LPS 处理 0(未处理)、1、2、4、6、8、12、24 h 诱导巨噬细胞炎症反应模型^[10],收集细胞进行后续检测,每个时间点每种细胞量为 5×10^6 个(细胞量下同)^[11-12]。提取细胞总 RNA,用实时荧光定量 RT-PCR 法检测促炎因子 mRNA 表达。引物由南通百奥迈科生物技术有限公司(下同)合成,见表 1。以 GAPDH 为内参照,通过基于 Δ 循环阈值(Ct)的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 IL-1 β 、IL-6、CC 趋化因子配体 2(CCL2)、TNF- α 的 mRNA 表达进行定量。根据上述炎症因子表达确定后续部分实验 LPS 处理时间,筛选标准:与处理 0 h 比较,2 种细胞各炎症因子均显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 采用实时荧光定量反转录 PCR 法检测小鼠 RAW264.7 巨噬细胞与腹腔巨噬细胞炎症因子 mRNA 表达的引物序列及产物大小

基因名称	引物序列(5'→3')	产物大小 (bp)
白细胞介素 1 β	上游:GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	116
	下游:TGGATGCTCTCATCAGGACAC	
白细胞介素 6	上游:CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	131
	下游:AGTGGTATAGACAGGTCTGTGG	
肿瘤坏死因子 α	上游:CAGGCGGTGCCTATGTCTC	89
	下游:CGATCACCCGAAGTTCAGTAG	
CC 趋化因子配体 2	上游:TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA	120
	下游:GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT	
3-磷酸甘油醛脱氢酶	上游:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	95
	下游:GGGTCGTTGATGGCAACA	

1.4 KLF4 在 RAW264.7 巨噬细胞中的定位与表达检测

1.4.1 KLF4 的定位与蛋白表达检测 取 RAW264.7 巨噬细胞同 1.3 采用 LPS 处理 0、8 h,采用免疫荧光法检测。一抗为兔抗小鼠 KLF4 单克隆抗体(稀释比为 1:100),二抗为 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:1 000)。用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶染色细胞核,采用生物导航仪于 20 倍下拍照记录 KLF4(阳性染色为红色)的定位与蛋白表达。

1.4.2 KLF4 在 mRNA 表达谱中差异的检测 取 RAW264.7 巨噬细胞同 1.3 采用 LPS 处理 0、8 h,提取细胞总 RNA,交由广州基迪奥生物科技有限公司进行 RNA 质检、转录组文库构建、转录组测序。采用 DESeq2 软件分析 2 种处理时间细胞间差异表达基因(DEG),筛选差异表达显著的 DEG,筛选标准为错误发现率 < 0.05 且 $|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$,其中

$\log_2(\text{差异倍数}) \geq 1$ 者为上调 DEG, $\log_2(\text{差异倍数}) \leq -1$ 者为下调 DEG。基于基迪奥生物信息云工具平台绘制火山图,对结果进行可视化展示。

1.5 KLF4 在巨噬细胞炎症反应中表达的检测

1.5.1 KLF4 的 mRNA 表达 同 1.3 取 PM 与 RAW264.7 巨噬细胞进行相应时间点 LPS 处理,用实时荧光定量 RT-PCR 法检测。KLF4 上游引物为 5'-GGCGACTCTGACATGGCTG-3'、下游引物为 5'-GCTGGACGCAGTGTCTTCTC-3',产物大小为 95 bp。

1.5.2 KLF4 蛋白表达 同 1.3 取 RAW264.7 巨噬细胞与 PM 进行相应时间点 LPS 处理,提取细胞总蛋白,采用蛋白质印迹法检测。一抗为兔抗小鼠 KLF4 单克隆抗体、兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体(稀释比均为 1:1 000),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:2 000)。使用 Image J 2.5.0 图像分析软件(美国国立卫生研究院)分析条带灰度值。以 GAPDH 为内参照,计算 KLF4 的蛋白表达量。

1.6 质粒载体介导的 KLF4 转染 RAW264.7 巨噬细胞效果观察

取 RAW264.7 巨噬细胞,采用随机数字表法分为阴性对照组与 KLF4 过表达组,均于 DMEM 培养基中加入 2 μL 转染试剂,分别加入 2 μg 空载质粒或 KLF4 过表达质粒,8 h 后更换为新鲜 DMEM 培养基,培养 48 h 后,分别用 LPS 处理 0、8 h,同 1.3 与 1.5.1 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 KLF4、IL-1 β 、IL-6、CCL2 与 TNF- α 的 mRNA 表达,同 1.5.2 采用蛋白质印迹法检测 KLF4 蛋白表达。

1.7 KLF4 过表达对脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤的影响

1.7.1 分组与处理 将 60 μg 空载质粒/KLF4 过表达质粒与 60 μL 微聚体体内转染试剂配制相应体内转染注射液,各制备 20 份。另取 40 只小鼠,按随机数字表法分为 KLF4 过表达组与阴性对照组(每组 20 只),分别在分组当天与分组后 3 d 通过尾静脉注射 1 份相应转染注射液。分组后 6 d 采用蔡维霞等^[13]的盲肠结扎穿孔术制备小鼠脓毒症模型,建模后放回鼠笼。

1.7.2 生存统计 采用随机数字表法从 2 组小鼠中各选取 12 只单笼饲养,密切观察小鼠状态,每 12 小时观察并计数小鼠死亡情况,持续观察至建模后 72 h。

1.7.3 促炎因子与脏器损伤情况观测 于建模

后 8 h 取 2 组分别剩余的 8 只小鼠,常规麻醉后先行眼球取血,制备血清,采用 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-6 表达,使用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值,计算 IL-1 β 、IL-6 水平;采用干化学法检测 ALT、AST 水平。取血后颈椎脱臼处死小鼠,分别提取肝脏、肺脏、心脏组织进行病理切片 HE 染色,于 200 倍光学显微镜下观察损伤情况。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于满足方差齐性的数据,2 组分组间比较采用独立样本 *t* 检验;单一细胞多个时间点总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett 检验(软件自动略去该统计量值)。对于不满足方差齐性的数据,2 组分组间比较行 Cochran&Cox 近似 *t* 检验;单一细胞多个时间点总体比较采用 Brown-Forsythe 和 Welch 单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett T3 检验(软件自动略去该统计量值)。生存比例差异分析采用 log-rank(Mantel-Cox)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

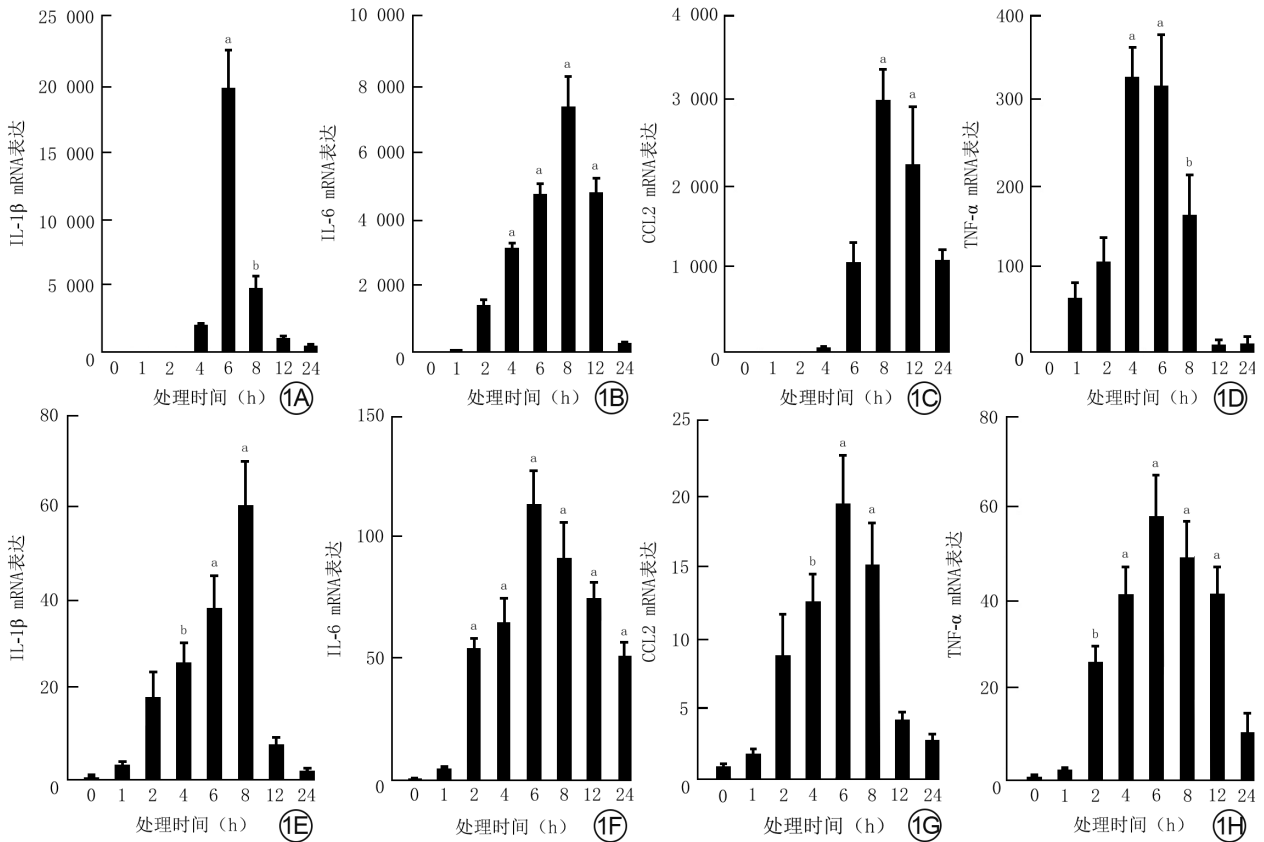
2 结果

2.1 巨噬细胞炎症反应模型中促炎因子 mRNA 表达

LPS 处理各时间点 RAW264.7 巨噬细胞与 PM 中 IL-1 β 、IL-6、CCL2、TNF- α mRNA 表达水平总体比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 42.45、50.21、16.01、16.65 与 18.28、20.40、9.59、15.76, $P < 0.001$)。与 LPS 处理 0 h 比较,LPS 处理 6 h 与 8 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β mRNA 表达、LPS 处理 4~12 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-6 mRNA 表达、LPS 处理 8 h 和 12 h RAW264.7 巨噬细胞中 CCL2 mRNA 表达以及 LPS 处理 4~8 h RAW264.7 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),LPS 处理 4~8 h PM 中 IL-1 β 与 CCL2 mRNA 表达、LPS 处理 2~24 h PM 中 IL-6 mRNA 表达以及 LPS 处理 2~12 h PM 中 TNF- α mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1。选取 8 h 作为后续部分实验的 LPS 处理时间。

2.2 KLF4 在 RAW264.7 巨噬细胞中的定位与表达

KLF4 主要定位于 RAW264.7 巨噬细胞的细胞核中,与 LPS 处理 0 h 比较,LPS 处理 8 h 的 RAW264.7 巨噬细胞伸出更多伪足,呈现出炎症分



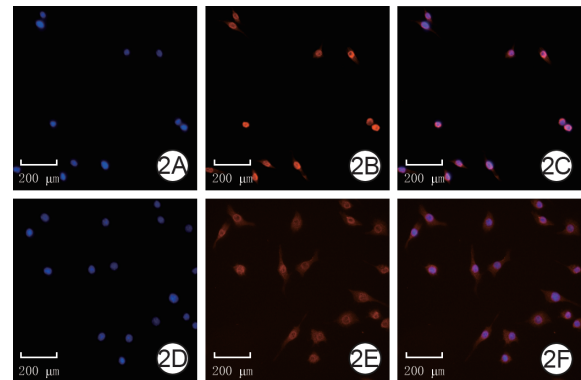
注:图 1A 与 1C 中处理 0 (未处理)、1、2 h 及图 1B 与 1D 中处理 0 h 的均数趋近于横坐标;IL 为白细胞介素,CCL2 为 CC 趋化因子配体 2, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,LPS 为内毒素/脂多糖,PM 为腹腔巨噬细胞;与 LPS 处理 0 h 比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

图 1 LPS 处理各时间点小鼠 RAW264.7 巨噬细胞及 PM 中各炎症因子的 mRNA 表达(样本数为 3, $\bar{x} \pm s$)。1A、1B、1C、1D. 分别为 RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6、CCL2、TNF- α mRNA 表达;1E、1F、1G、1H. 分别为 PM 中 IL-1 β 、IL-6、CCL2、TNF- α mRNA 表达

化型形态,同时 KLF4 蛋白表达明显减少。见图 2。与 LPS 处理 0 h 比较,LPS 处理 8 h RAW264.7 巨噬细胞中有 1 470 个差异表达显著的 DEG,包括转录表达显著下调的 *KLF4*[错误发现率 < 0.05 , \log_2 (差异倍数) $= -2.47$]。见图 3。

2.3 KLF4 在巨噬细胞炎症反应中的表达

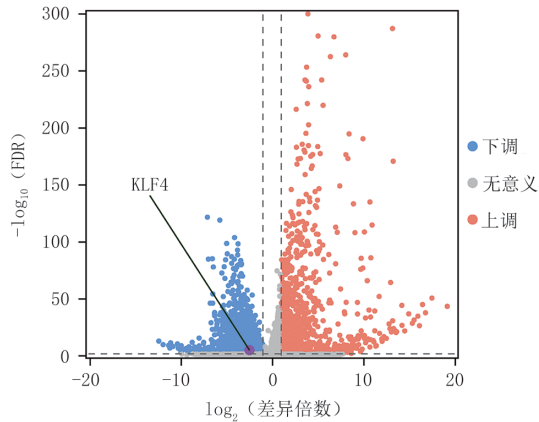
LPS 处理 0、1、2、4、6、8、12、24 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的 mRNA 表达量分别为 1.000 ± 0.208 、 0.953 ± 0.141 、 0.838 ± 0.125 、 0.633 ± 0.108 、 0.589 ± 0.023 、 0.204 ± 0.051 、 0.203 ± 0.063 、 0.093 ± 0.004 ,KLF4 蛋白表达量分别为 1.423 ± 0.076 、 1.017 ± 0.054 、 0.911 ± 0.051 、 0.955 ± 0.056 、 0.508 ± 0.035 、 0.331 ± 0.018 、 0.279 ± 0.015 、 0.827 ± 0.074 ,总体比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 31.76、166.50, $P < 0.001$)。与 LPS 处理 0 h 比较,LPS 处理 6~24 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的 mRNA 表达与 LPS 处理 1~24 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的蛋白表达均明显降低($P < 0.01$)。LPS 处理 0、1、2、4、6、8、12、24 h PM 中 KLF4 的 mRNA 表达量分别为



注:LPS 为内毒素/脂多糖;细胞核阳性染色为蓝色,Krüppel 样因子 4 (KLF4) 阳性染色为红色

图 2 LPS 处理不同时间点小鼠 RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的定位与蛋白表达 Alexa Fluor 594-4',6-二胺基-2-苯基吡啶 $\times 20$ 。2A、2B、2C. 分别为 LPS 处理 0 h (未处理) 细胞核染色、KLF4 染色、细胞核与 KLF4 染色重叠图片,细胞核完整,KLF4 蛋白表达较多且主要定位在细胞核中;2D、2E、2F. 分别为 LPS 处理 8 h 细胞核染色、KLF4 染色、细胞核与 KLF4 染色重叠图片,细胞核完整,图 2E 中 KLF4 蛋白表达较图 2B 减少

1.00 ± 0.19 、 0.88 ± 0.22 、 0.74 ± 0.27 、 0.56 ± 0.12 、 0.51 ± 0.05 、 0.34 ± 0.06 、 0.31 ± 0.07 、 0.30 ± 0.04 ,

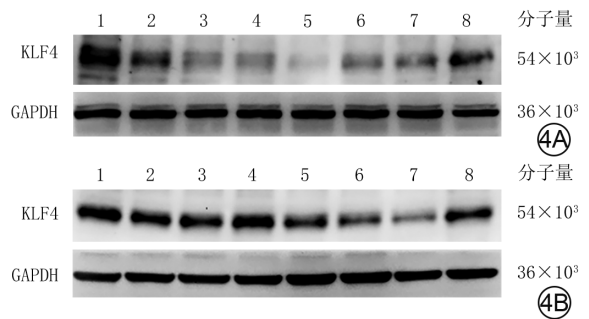


注:FDR为错误发现率,KLF4为Krüppel样因子4,LPS为内毒素/脂多糖
图3 小鼠RAW264.7巨噬细胞经LPS处理8h相较于LPS处理0h(未处理)的差异表达基因可视化火山图

KLF4 蛋白表达量分别为 1.084 ± 0.042 、 0.559 ± 0.011 、 0.357 ± 0.009 、 0.281 ± 0.015 、 0.109 ± 0.005 、 0.267 ± 0.010 、 0.341 ± 0.010 、 0.614 ± 0.014 , 总体比较, 差异均有统计学意义 (F 值分别为 32.71、833.80, $P < 0.001$)。与 LPS 处理 0 h 比较, LPS 处理 4~24 h PM 中 KLF4 的 mRNA 表达与 LPS 处理 1~24 h PM 中 KLF4 的蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 4。

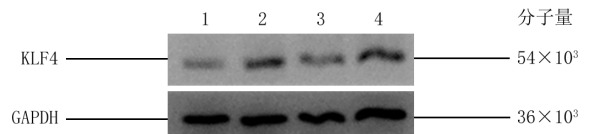
2.4 质粒载体介导的 KLF4 转染 RAW264.7 巨噬细胞效果

与阴性对照组比较, KLF4 过表达组 LPS 处理 0、8 h RAW264.7 巨噬细胞中 KLF4 的 mRNA ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 与蛋白表达均明显升高, LPS 处理 0 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-6、CCL2 的 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LPS 处理 8 h RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6、CCL2、TNF- α 的



注:KLF4为Krüppel样因子4,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;条带上方1、2、3、4、5、6、7、8分别指示内毒素/脂多糖(LPS)处理0(未处理)、1、2、4、6、8、12、24 h
图4 采用蛋白质印迹法检测LPS处理各时间点小鼠RAW264.7巨噬细胞与腹腔巨噬细胞中KLF4蛋白表达。4A. RAW264.7巨噬细胞;4B. 腹腔巨噬细胞

mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.01$)。见图 5、表 2。



注:KLF4为Krüppel样因子4,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;条带上方1、3分别指示内毒素/脂多糖(LPS)处理0(未处理)、8 h 阴性对照组,2、4分别指示LPS处理0、8 h KLF4过表达组
图5 采用蛋白质印迹法检测LPS处理2个时间点2组小鼠RAW264.7巨噬细胞中KLF4蛋白表达

2.5 脓毒症小鼠的生存统计

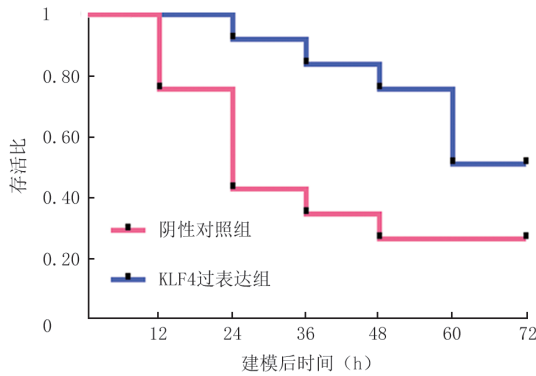
阴性对照组小鼠建模后 12 h 内出现死亡, 12 h 时存活 9 只, 24、36、48 h 时分别存活 5、4、3 只, 之后保持稳定至 72 h; KLF4 过表达组小鼠建模后 24 h 内出现死亡, 24 h 时存活 11 只, 36、48、60 h 时分别存活 10、9、6 只, 之后保持稳定至 72 h。与阴性对照组比较, KLF4 过表达组小鼠建模后 72 h 内生存比例显

表2 2组小鼠RAW264.7巨噬细胞经LPS处理各时间点KLF4与炎症因子mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别与时间点	样本数	KLF4	IL-1 β	IL-6	CCL2	TNF- α
阴性对照组						
0 h	3	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.11	1.0 \pm 0.5	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.08
8 h	3	0.21 \pm 0.04	2 099.00 \pm 260.50	5 115.0 \pm 706.5	2 575.00 \pm 375.50	155.40 \pm 20.73
KLF4过表达组						
0 h	3	150.10 \pm 26.27	1.32 \pm 0.23	3.9 \pm 0.6	2.13 \pm 0.54	1.24 \pm 0.61
8 h	3	113.30 \pm 22.74	435.10 \pm 84.53	1 085.0 \pm 172.5	1 342.00 \pm 276.10	41.42 \pm 10.02
统计量值1		t' =17.03	t =2.16	t =6.29	t =3.40	t =0.67
P_1 值		0.003	0.097	0.003	0.027	0.846
统计量值2		t' =8.61	t =10.52	t =9.60	t =4.58	t =8.58
P_2 值		0.013	0.001	0.001	0.009	0.001

注:LPS为内毒素/脂多糖,KLF4为Krüppel样因子4,IL为白细胞介素,CCL2为CC趋化因子配体2,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,统计量值1、 P_1 值,统计量值2、 P_2 值分别为LPS处理0(未处理)、8 h时2组间比较所得

著提高 ($P < 0.05$)。见图 6。



注: KLF4 为 Krüppel 样因子 4

图 6 生存曲线显示 KLF4 过表达组脓毒症小鼠建模后 72 h 内存活比显著高于阴性对照组, $\chi^2=4.01, P=0.045$ (样本数为 12)

2.6 脓毒症小鼠血清炎症因子与脏器功能指标水平

建模后 8 h, 与阴性对照组比较, KLF4 过表达组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、ALT、AST 水平均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 2 组脓毒症小鼠建模后 8 h 血清中炎症因子与脏器功能指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
阴性对照组	8	257 \pm 58	654 \pm 129	196 \pm 27	407 \pm 84
KLF4 过表达组	8	161 \pm 63	476 \pm 161	144 \pm 24	264 \pm 93
<i>t</i> 值		3.16	2.44	4.04	3.24
<i>P</i> 值		0.007	0.028	0.001	0.006

注: KLF4 为 Krüppel 样因子 4, IL 为白细胞介素, ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶

2.7 脓毒症小鼠脏器损伤情况

建模后 8 h, 阴性对照组小鼠肝细胞存在空泡样变性, 细胞质皱缩, 部分肝小叶正常结构破坏; 肺间质充血, 肺泡水肿、出血, 肺间质与肺泡腔内可见大量粉红色炎性渗出; 心肌细胞肿胀、排列紊乱、界限不清、着色深浅不均、细胞质皱缩、部分细胞质呈不规则粗颗粒状, 部分肌纤维及间质变性肿胀。与阴性对照组比较, KLF4 过表达组小鼠肝细胞形态基本正常, 肝小叶结构完整; 肺泡腔渗出少, 肺间质无明显异常; 心肌组织损伤轻, 心肌细胞排列较整齐, 间质水肿较轻。见图 7。

3 讨论

脓毒症的发生机制复杂, 涉及众多相互协同或

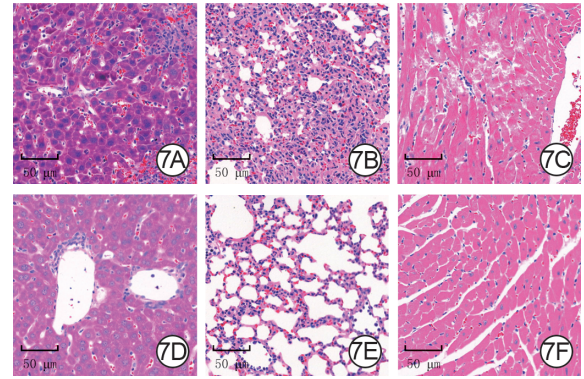


图 7 2 组脓毒症小鼠建模后 8 h 脏器损伤情况 苏木精-伊红 $\times 200$ 。7A、7B、7C. 分别为阴性对照组肝脏、肺脏、心脏组织, 肝细胞存在空泡样变性且部分肝小叶正常结构破坏, 肺间质与肺泡腔内可见大量粉红色炎性渗出, 心肌细胞排列紊乱且间质水肿; 7D、7E、7F. 分别为 Krüppel 样因子 4 过表达组肝脏、肺脏、心脏组织, 肝细胞形态较图 7A 正常且肝小叶结构完整, 肺泡腔内渗出较图 7B 明显减少且肺间质无明显异常, 心肌组织损伤较图 7C 轻且心肌细胞排列较整齐

相互诱生的免疫细胞及炎症因子, 其中巨噬细胞具有重要作用^[14-16]。本课题组选用 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞与 PM 作为研究脓毒症炎症反应的细胞模型, 证实 LPS 处理 8 h 后 2 种巨噬细胞中炎症因子同 0 h 相比均有显著差异, 因此选取 8 h 作为后续部分实验 LPS 处理时间, 观察 KLF4 在巨噬细胞炎症反应中的表达与作用。

目前对 KLF4 的功能研究主要集中在细胞干性、生长发育、肿瘤发生发展等方面^[17], 而 KLF4 在炎症中的表达与调节作用仍存在争议。本研究显示, 在 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应中, KLF4 的免疫荧光核表达与转录组表达均显著下降, 并通过进一步 mRNA 与蛋白表达检测进行了验证。该结果说明 KLF4 表达和活性状态, 与巨噬细胞炎症反应状态具有明显的相关性, 与相关文献结果^[18-19]一致。然而, 也有与本研究结果不同的报道, 如 Feinberg 等^[20]研究显示, 用 γ 干扰素、LPS 与 TNF- α 分别诱导 THP-1 人巨噬细胞与 J774a 小鼠巨噬细胞, 均能够促进 KLF4 表达, 而用 TGF- β_1 诱导则抑制 KLF4 表达。也有研究表明, 在小胶质细胞中 LPS 能够诱导 KLF4 以时间与剂量依赖性方式表达增强^[21]。综上, 本课题组推测 KLF4 是调节脓毒症炎症反应的重要分子。

脓毒症发生时, 巨噬细胞持续活化, 大多向 M1 型分化, 引发失控性炎症反应, 导致器官及组织损伤。而巨噬细胞的分化具有可逆性, 它可以在 M1 型与 M2 型之间相互转化^[22]。KLF4 也与巨噬细

胞的 M1 型和 M2 型交互调控有着密切关联^[23-25]。Wen 等^[26] 研究显示, 在小鼠慢性肾病模型中, KLF4 髓系缺失显著增强肾脏浸润的巨噬细胞向 M1 型极化, 加重肾小球基质沉积和小管上皮损伤, 证实 KLF4 能够通过抑制髓系细胞 TNF- α 生成, 显著抑制巨噬细胞向促炎表型分化。而 KLF4 与巨噬细胞促炎因子 IL-1 β 、IL-6、CCL2 之间的调控关系尚未明确, 故本课题组开展相关研究, 进一步明确 KLF4 与这些炎症因子之间的调控关系。通过体外功能获得性实验证实, KLF4 过表达能够显著抑制 LPS 处理 8 h 的巨噬细胞中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、CCL2 与 TNF- α 的表达; 然而 LPS 诱导 0 h 时 KLF4 过表达与阴性对照之间存在 IL-6、CCL2 表达的显著差异, 这可能与样本量较小有关。进一步通过体内功能获得性实验证实, KLF4 过表达提高了脓毒症小鼠的生存比例, 并显著缓解炎症反应与脓毒症相关脏器损伤。上述结果证实, KLF4 能够通过下调促炎因子的方式发挥抗炎功能, 与相关研究结论^[22-23, 26] 相符。另有研究从其他炎症相关因子与干预方式着手, 分析了 KLF4 调控炎症的机制。如 Chang 等^[27] 观察到内皮细胞能够通过输送微小 RNA-92a 抑制巨噬细胞中靶基因 *KLF4* 的表达, 进而影响巨噬细胞抗动脉粥样硬化的炎症表型。此外, Li 等^[28] 研究显示 KLF4 能够通过去泛素化酶入巨噬细胞趋化蛋白-1 诱导蛋白介导 TNF 受体相关因子 6 去泛素化, 进而影响经典核因子 κ B 炎症信号通路抑制炎症因子表达。与本研究结果不同的是, Kaushik 等^[21] 研究表明 KLF4 的敲除导致小胶质细胞促炎因子 TNF- α 、CCL2、IL-6、诱导型 NOS 和环氧合酶 2 水平显著降低。亦有研究表明在人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞中, KLF4 能够通过直接结合 IL-6 启动子激活 IL-6 表达, 展现出显著的促炎效应^[29]。目前推测, 这些差异性结果与细胞系与模型的选择有关。

尽管本研究证实 KLF4 在脓毒症中具有显著的抗炎抗损伤效应, 然而对相关机制的研究还不够深入, 未来可进一步探索 KLF4 翻译后修饰的途径, 深入研究改变 KLF4 的蛋白质稳定性、DNA 结合能力和转录活性来调控其抗炎功能的多种分子机制。此外, 本实验中的体外研究以巨噬细胞为核心, 使用 KLF4 过表达载体干预巨噬细胞, 然而在体内实验中并未靶向巨噬细胞对 KLF4 进行基因干预, 缺乏 KLF4 在体内对巨噬细胞调控效应的直接证据。

综上, 本研究证实 KLF4 在 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应中表达显著下降, 显著抑制巨噬细胞炎症反应, 显著提高脓毒症小鼠生存率并缓解炎症反应与脓毒症相关脏器损伤。后续研究将进一步寻找 KLF4 抗炎作用的靶分子, 明确其对脓毒症炎症反应中巨噬细胞异常活化抑制作用的关键靶点, 以期为研制治疗烧伤脓毒症的临床新药物提供更为可靠的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王运帷、张清怡: 实验操作、论文撰写; 刘洋、官浩: 研究指导、论文修改以及经费支持; 曹鹏、陈阳、李少琿: 数据整理、统计分析

参考文献

- [1] van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(7):407-420. DOI:10.1038/nri.2017.36.
- [2] Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis[J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 63-80. DOI: 10.1016/j.ccc.2017.08.003.
- [3] Kumar V. Targeting macrophage immunometabolism: dawn in the darkness of sepsis[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 58: 173-185. DOI:10.1016/j.intimp.2018.03.005.
- [4] Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): what we currently know[J]. Gene, 2017, 611: 27-37. DOI: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
- [5] Wang J, Zhao M, Zhang H, et al. KLF4 alleviates hypertrophic scar fibrosis by directly activating BMP4 transcription[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(8):3324-3336. DOI:10.7150/ijbs.71167.
- [6] Wang K, Zhou W, Cai Q, et al. SUMOylation of KLF4 promotes IL-4 induced macrophage M2 polarization[J]. Cell Cycle, 2017, 16(4):374-381. DOI:10.1080/15384101.2016.1269045.
- [7] Rosenzweig JM, Glenn JD, Calabresi PA, et al. KLF4 modulates expression of IL-6 in dendritic cells via both promoter activation and epigenetic modification[J]. J Biol Chem, 2013, 288(33): 23868-23874. DOI:10.1074/jbc.M113.479576.
- [8] Liu J, Liu Y, Zhang H, et al. KLF4 promotes the expression, translocation, and release of HMGB1 in RAW264.7 macrophages in response to LPS[J]. Shock, 2008, 30(3):260-266. DOI: 10.1097/shk.0b013e318162bef7.
- [9] Bain CC, Jenkins SJ. Isolation and identification of murine serous cavity macrophages[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1784:51-67. DOI: 10.1007/978-1-4939-7837-3_5.
- [10] Yang Y, Liu Y, He X, et al. ING4 alleviated lipopolysaccharide-induced inflammation by regulating the NF- κ B pathway via a direct interaction with SIRT1[J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(2):127-137. DOI:10.1111/imcb.12308.
- [11] Kim HJ, Joe HI, Zhang Z, et al. Anti-inflammatory effect of *Acalypha australis* L. via suppression of NF- κ B signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and LPS-induced septic mice[J]. Mol Immunol, 2020, 119:123-131. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.01.010.
- [12] Bhardwaj M, Sali VK, Mani S, et al. Neophytadiene from *Turbinaria ornata* suppresses LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and Sprague Dawley rats [J]. Inflammation, 2020, 43(3):937-950. DOI:10.1007/s10753-020-01179-z.

- [13] 蔡维霞,沈括,曹涛,等.人脂肪间充质干细胞来源外泌体对脓毒症小鼠肺血管内皮细胞损伤的影响及其机制[J].中华烧伤与创面修复杂志,2022,38(3):266-275. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211020-00362.
- [14] Arts RJ, Gresnigt MS, Joosten LA, et al. Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis[J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(1): 151-164. DOI:10.1189/jlb.4MR0216-066R.
- [15] Qiu P, Liu Y, Zhang J. Review: the role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis[J]. Inflammation, 2019, 42(1): 6-19. DOI:10.1007/s10753-018-0890-8.
- [16] Zhang P, Zou B, Liou YC, et al. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury[J/OL]. Burns Trauma, 2021, 9: tkaa047[2022-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654698/>. DOI:10.1093/burnst/tkaa047.
- [17] Hsieh PN, Fan L, Sweet DR, et al. The Krüppel-like factors and control of energy homeostasis[J]. Endocr Rev, 2019, 40(1): 137-152. DOI:10.1210/er.2018-00151.
- [18] Li C, Yu L, Mai C, et al. KLF4 down-regulation resulting from TLR4 promotion of ERK1/2 phosphorylation underpins inflammatory response in sepsis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(4): 2013-2024. DOI:10.1111/jcmm.16082.
- [19] Li W, Wang J, Li Z. ALK5 deficiency inhibits macrophage inflammation and lipid loading by targeting KLF4[J]. Biosci Rep, 2020, 40(3): BSR20194188. DOI:10.1042/BSR20194188.
- [20] Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, et al. Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages[J]. J Biol Chem, 2005, 280(46): 38247-38258. DOI:10.1074/jbc.M509378200.
- [21] Kaushik DK, Gupta M, Das S, et al. Krüppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2010, 7: 68. DOI:10.1186/1742-2094-7-68.
- [22] 姚咏明, 栾樱译. 烧创伤脓毒症免疫状态精准评估及其价值[J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(11): 786-789. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.11.013.
- [23] Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, et al. Different pathways of macrophage activation and polarization[J/OL]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2015, 69: 496-502[2022-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25983288/>. DOI: 10.5604/17322693.1150133.
- [24] Pan Y, Hui X, Hoo RLC, et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation[J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 834-849. DOI:10.1172/JCI123069.
- [25] Das LM, Binko AM, Traylor ZP, et al. Vitamin D improves sunburns by increasing autophagy in M2 macrophages[J]. Autophagy, 2019, 15(5): 813-826. DOI: 10.1080/15548627.2019.1569298.
- [26] Wen Y, Lu X, Ren J, et al. KLF4 in macrophages attenuates TNF α -mediated kidney injury and fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(10): 1925-1938. DOI:10.1681/ASN.2019020111.
- [27] Chang YJ, Li YS, Wu CC, et al. Extracellular microRNA-92a mediates endothelial cell-macrophage communication[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(12): 2492-2504. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312707.
- [28] Li Z, Jia Y, Han S, et al. Klf4 alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by inducing expression of MCP-1 induced protein 1 to deubiquitinate TRAF6[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(6): 2278-2290. DOI:10.1159/000491538.
- [29] Luo X, Chen J, Ruan J, et al. Krüppel-like factor 4 is a regulator of proinflammatory signaling in fibroblast-like synoviocytes through increased IL-6 expression[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 1062586. DOI:10.1155/2016/1062586.

(收稿日期: 2022-01-11)

·《Burns & Trauma》好文推荐·

硅酸钙通过激活表皮生长因子/表皮生长因子受体/胞外信号调节激酶信号通路改善人表皮干细胞的功能以加速皮肤创面愈合

引用格式: Li B, Tang H, Bian X, et al. Calcium silicate accelerates cutaneous wound healing with enhanced re-epithelialization through EGF/EGFR/ERK-mediated promotion of epidermal stem cell functions [J/OL]. Burns Trauma, 2021, 9: tkab029[2022-09-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34604395/>. DOI: 10.1093/burnst/tkab029.

人表皮干细胞(hESC)在促进创面愈合及再上皮化过程中发挥着重要作用,但激活hESC的有效方法仍有待探索。2021年9月解放军总医院第四医学中心(医学创新研究部创伤修复与组织再生研究中心)付小兵院士和张翠萍教授团队在《Burns & Trauma》发文《Calcium silicate accelerates cutaneous wound healing with enhanced re-epithelialization through EGF/EGFR/ERK-mediated promotion of epidermal stem cell functions》,该文探讨了硅酸钙对hESC的作用及其可能机制。该研究观察到,通过稀释硅酸钙离子提取物来培养hESC,可改善其增殖能力、迁移能力和干性等生物学特性,同时证实了硅酸钙可激活EGF/EGF受体(EGFR)/胞外信号调节激酶(ERK)信号通路。该研究还采用小鼠全层皮肤缺损模型探讨了硅酸钙在创面愈合和再上皮化中的作用,结果显示硅酸钙上调了细胞角蛋白19和整合素 β_1 的表达,提示硅酸钙改善了hESC的干性并促进创面愈合及再上皮化。综上,该研究阐明了硅酸钙可通过激活EGF/EGFR/ERK信号通路,促进hESC的再上皮化并改善其生物学功能。

程卓,编译自《Burns Trauma》,2021,9:tkab029;史春梦,审校