

研究论文

蛋白酶3在急性肺损伤相关的细胞铁死亡中的作用及机制研究

赵红菲^{1,2} 刘欢^{1,2} 邵雅^{1,2} 赵梓含^{1,2} 张诗悦^{1,2} 赵宏润^{1,2} 刘悦辛^{1,2} 成天然^{1,2} 孙露^{1,2}
席静雯^{1,2} 王彤^{1,2} 许元富^{1,2*}⁽¹⁾中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 北京协和医学院, 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020; ⁽²⁾天津医学健康研究院, 天津 301600

摘要 该研究探讨了蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3)在脓毒症诱发的急性肺损伤中的作用及其潜在调控机制。研究中采用腹腔注射不同剂量的LPS(50 mg/kg和10 mg/kg)分别来诱导WT小鼠及*Prtn3*基因敲除小鼠(*Prtn3*^{-/-})脓毒症模型和急性肺损伤(acute lung injury, ALI)模型; 采用血常规分析各组小鼠肺泡灌洗液中的各系血细胞的数目和比例, 采用qRT-PCR分析小鼠肺组织炎症因子及铁死亡相关基因表达变化。通过免疫荧光、ELISA和qRT-PCR分析*Prtn3*缺失对铁死亡激动剂(RSL3)处理的中性粒细胞铁死亡的影响。RNA测序分析*Prtn3*调控中性粒细胞铁死亡的潜在分子机制。结果显示, *Prtn3*缺失显著提高了LPS诱导的脓毒症小鼠的总体生存率($P<0.05$); 组织病理学、血常规结果表明*Prtn3*基因缺失显著缓解了脓毒症相关急性肺损伤的病理改变和炎症反应($P<0.05$); qRT-PCR结果显示, *Prtn3*^{-/-}+LPS小鼠肺组织中*Slc7a11*、*Gpx4*等铁死亡标志物的表达水平明显高于WT+LPS组。体外细胞实验结果显示, RSL3处理的中性粒细胞中铁水平、脂质过氧化产物4-HNE和MDA的水平均呈剂量依赖性升高($P<0.05$); ELISA、免疫荧光及qRT-PCR结果显示, *Prtn3*的敲除抑制了RSL3诱导的铁积累, 显著提高了*Gpx4*水平, 降低了脂质过氧化产物含量。RNA测序分析结果显示: RSL3+*Prtn3*^{-/-}组中与ROS代谢途径、炎症反应、TNF信号通路、Toll-like receptor信号通路、NF-kappa B信号通路和严重的炎症感染等相关的基因表达发生了显著改变。综上所述, *Prtn3*缺失能通过抑制中性粒细胞的铁死亡, 显著减轻脓毒症所诱导的急性肺损伤, 而通过降低*Prtn3*的表达水平来抑制细胞铁死亡是一种新的减轻脓毒症所致ALI的有效策略。

关键词 蛋白酶3; 脓毒症; 急性肺损伤; 中性粒细胞; 铁死亡

The Role and Mechanism of Proteinase 3 in Ferroptosis-Associated Acute Lung Injury

ZHAO Hongfei^{1,2}, LIU Huan^{1,2}, SHAO Ya^{1,2}, ZHAO Zihan^{1,2}, ZHANG Shiyue^{1,2}, ZHAO Hongrun^{1,2}, LIU Yuexin^{1,2},
CHENG Tianran^{1,2}, SUN Lu^{1,2}, XI Jingwen^{1,2}, WANG Tong^{1,2}, XU Yuanfu^{1,2*}

收稿日期: 2025-03-10

接受日期: 2025-04-17

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-12M-1-017)和国家自然科学基金(批准号: 81970107)资助的课题

*通信作者。Tel: 13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: March 10, 2025

Accepted: April 17, 2025

This work was supported by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2021-12M-1-017) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107)

*Corresponding author. Tel: +86-13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

(¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China)

Abstract This study investigates the role of PRTN3 (proteinase 3) in sepsis-induced ALI (acute lung injury) and its potential regulatory mechanisms. WT (wild-type) and *Prtn3*^{-/-} (*Prtn3* knockout) mice were used to establish sepsis and ALI models through intraperitoneal injection of different doses of LPS (lipopolysaccharide) (50 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). Hematological analysis was performed to examine the number and proportion of different blood cell types in the BALF (bronchoalveolar lavage fluid). qRT-PCR was used to analyze the expression changes of inflammatory cytokines and ferroptosis-related genes in mouse lung tissues. The effects of *Prtn3* deletion on ferroptosis in neutrophils treated with the ferroptosis inducer RSL3 were assessed using immunofluorescence, ELISA, and qRT-PCR. RNA sequencing was conducted to explore the potential molecular mechanisms by which *Prtn3* regulates neutrophil ferroptosis. The results showed that *Prtn3* deficiency significantly improved the overall survival rate of LPS-induced septic mice ($P < 0.05$). Histopathological and hematological analysis indicated that *Prtn3* deficiency markedly reduced pathological changes and inflammatory responses associated with sepsis-induced ALI ($P < 0.05$). The qRT-PCR results demonstrated that the expression levels of ferroptosis markers such as *Slc7a11* and *Gpx4* in lung tissues of *Prtn3*^{-/-}+LPS mice were significantly higher than those in the WT+LPS group. *In vitro* experiments demonstrated that RSL3-treated neutrophils exhibited dose-dependent increases in iron levels and lipid peroxidation products, including 4-HNE and MDA ($P < 0.05$). ELISA, immunofluorescence, and qRT-PCR analyses showed that *Prtn3* knockout inhibited RSL3-induced iron accumulation, significantly increased *Gpx4* levels, and reduced lipid peroxidation product content. RNA sequencing analysis revealed that the expression of genes associated with ROS metabolism, inflammatory response, TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, and severe inflammatory infections was significantly changed in the RSL3+*Prtn3*^{-/-} group. In conclusion, *Prtn3* deficiency reduces sepsis-induced ALI by inhibiting neutrophil ferroptosis. Targeting *Prtn3* to suppress ferroptosis presents a novel and effective strategy for alleviating sepsis-induced ALI.

Keywords proteinase 3; sepsis; acute lung injury; neutrophils; ferroptosis

脓毒症(sepsis)是一种由感染引起的急性全身炎症反应综合征,伴有急性器官功能障碍^[1][例如:急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)及其前期病变急性肺损伤(acute lung injury, ALI)],与极高的死亡风险紧密相连^[2]。脓毒症相关性肺损伤(sepsis-induced acute lung injury, SALI)主要源于血管内皮细胞与肺泡上皮细胞的双重损害,这导致肺泡-毛细血管屏障通透性异常增高,同时也会引起肺泡表面活性物质分泌的显著减少^[3]。尽管SALI的机制已被广泛研究数十年,但至今仍缺乏十分有效的治疗靶点和延缓疾病进展的策略^[4]。

铁死亡(ferroptosis)是近期发现的一种新的程序性细胞死亡模式,与传统的细胞凋亡相比,其在形态学和生化特征上存在显著不同。该死亡形式最显著的生物学标志是铁离子依赖性脂质过氧化产物在细

胞内的异常蓄积^[5]。抑制溶质载体家族7成员11/谷胱甘肽过氧化物酶4(SLC7A11/GPX4)抗氧化系统和促进游离铁积累是诱导铁死亡的两个关键信号^[6]。近期的研究揭示了铁死亡在脓毒症及其引发的多器官功能障碍病理过程中发挥着关键作用^[7]。

蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3),是一种多功能的中性丝氨酸蛋白酶,最早是由BAGGIOLINI等^[8]在中性粒细胞颗粒中发现的,可经脱颗粒方式被细胞释放到胞外,具有水解多种细胞外基质蛋白的能力,与病原体清除和组织损伤有关。研究发现在肺组织中PRTN3蛋白主要高表达于中性粒细胞^[8]。近期我们陆续报道了*Prtn3*在细胞内也起着重要作用,例如:*Prtn3*在小鼠造血干/祖细胞,尤其是在髓系祖细胞(常见髓系祖细胞和粒细胞-巨噬细胞祖细胞)中持续高表达,并且与细胞的衰老和髓系分化调控

密切相关; PRTN3在衰老的中性粒细胞中可以通过剪切和激活 pro-caspase-3来调节中性粒细胞自发生死亡^[9-10]。然而, *Prtn3*在脓毒症诱发的急性肺损伤中的作用和潜在机制仍不清楚。为此, 本研究旨在阐明 *Prtn3*在脓毒症相关急性肺损伤中的作用及其分子机制, 并为开发针对脓毒症发生发展的干预策略提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究所采用的 *Prtn3*基因敲除小鼠模型由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供, 并以同窝野生型(WT)小鼠作为对照。实验动物均在中国医学科学院血液学研究所SPF级动物实验中心进行饲养, 所有动物均给予标准配方饲料, 并保证其自由摄食和饮水。本实验方案已获得中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会的批准(批准号: IHCAMS-DWLL-2024-0022)。

1.2 小鼠脓毒症相关肺损伤模型建立及实验分组

本研究将实验动物按照随机数字表进行分组, 共设立4个实验组: WT对照组、WT+LPS组、*Prtn3*^{-/-}对照组、*Prtn3*^{-/-}+LPS组, 每组样本量各12只。实验组动物经腹腔注射 50 mg/kg或 10 mg/kg的 LPS 分别诱导 ALI模型和脓毒症模型, 对照组实验动物经腹腔注射等体积生理盐水。造模24 h后, 采用10%水合氯醛腹腔注射对实验动物实施麻醉处理, 随后暴露小鼠胸腔。在气管近心端前壁穿刺并插入注射针头。通过注射器缓慢注入 1 mL PBS缓冲液, 静置 2 min后回收灌洗液, 重复上述灌洗操作5次。最后, 使用双层医用纱布过滤收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 同时摘取肺组织标本, 置于-80 °C保存备用, 用于后续相关指标的检测分析。

1.3 肺ALI病理评分

从实验组和对照组中各取肺组织样本, 经生理盐水充分冲洗后, 以滤纸吸除表面水分。将组织置于4%多聚甲醛溶液中室温固定处理, 经石蜡包埋后制备3 μm厚度的切片。采用苏木精-伊红(HE)染色法对组织切片进行染色, 封片后于光学显微镜下观察。参照文献[11]中的评分标准, 从以下4个方面对肺组织损伤程度进行量化评估: (1) 肺泡充血程度; (2) 间质水肿情况; (3) 中性粒细胞在间质或血管壁

的浸润聚集程度; (4) 肺泡隔增厚或透明膜形成情况。各指标按损伤程度分为5个等级: 0分表示无损伤; 1分表示损伤面积小于25%; 2分表示损伤面积在25%~50%之间; 3分表示损伤面积达50%~75%; 4分表示损伤面积超过75%。将4项评分累加, 作为ALI的病理学评分结果。

1.4 小鼠骨髓中性粒细胞的分离

骨髓源性中性粒细胞分离与培养实验步骤如下: 首先获取实验动物后肢骨骼, 采用 1 mL无菌注射器冲洗骨髓腔获取细胞悬液, 经 200目细胞筛网过滤后重悬细胞。随后, 使用Percoll分离液(GE公司)构建 52%、62%、76%三梯度密度体系, 室温 2 000 r/min梯度离心 30 min。收集 62%~76%界面层中性粒细胞, 采用 HBSS-EDTA-BSA缓冲液(含 0.5%牛血清白蛋白、15 mmol/L EDTA, 不含 Ca²⁺/Mg²⁺)洗涤 1次。继而使用 Histopaque-1119(Sigma公司)进行二次密度梯度离心(2 000 r/min、30 min、室温)以去除红细胞。收集纯化后的中性粒细胞, 重悬于补充 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1%青霉素-链霉素双抗的 RPMI-1640培养基(Gibco公司)中, 在 37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中进行体外培养, 并定期观察细胞状态。

1.5 RSL3诱导中性粒细胞铁死亡及分组

RSL3(MedChemExpress公司)使用DMSO溶解稀释至 10 mmol/L。从 8至 12周龄的野生型小鼠中分离出骨髓中性粒细胞, 调整细胞悬液浓度至 5×10⁵/mL, 经不同浓度 RSL3(3 μmol/L、7 μmol/L、10 μmol/L)或溶剂(溶剂作对照)处理后, 在 37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养 16 h。采用密度梯度离心法分别从 *Prtn3*基因缺陷型小鼠及其野生型对照小鼠中分离骨髓来源的中性粒细胞。随后, 将上述细胞分别暴露于铁死亡诱导剂 RSL3进行处理, 根据基因型和药物处理情况分为4个平行组别: WT小鼠中性粒细胞+溶剂对照组、WT小鼠中性粒细胞+7 μmol/L RSL3组、*Prtn3*^{-/-}小鼠中性粒细胞+溶剂对照组、*Prtn3*^{-/-}小鼠中性粒细胞+7 μmol/L RSL3组, 调整各组细胞悬液浓度为 5×10⁵/mL, 接种于同一块培养板内, 并在 37 °C、5% CO₂细胞培养箱中持续培养 16 h。

1.6 CCK-8法检测中性粒细胞活性

实验细胞在 37 °C、5% CO₂的培养箱中进行预培养。设置6个复孔, 每孔分别加入 10 μL CCK-8试剂, 继续培养 4 h。培养结束后, 采用酶标仪于 450 nm波长处测定各孔的吸光度(D)值。细胞活力按下式计算:

细胞活力(%)=[$D(\text{处理})-D(\text{空白})$]/[$D(\text{未处理})-D(\text{空白})$] $\times 100\%$, 公式中, $D(\text{处理})$ 表示含有细胞、CCK-8试剂及药物溶液的检测孔测定值; $D(\text{空白})$ 表示仅含培养基和CCK-8试剂的无细胞孔测定值; $D(\text{未处理})$ 表示含有细胞和CCK-8试剂但不含药物的对照孔测定值。

1.7 中性粒细胞及肺组织ROS、4-HNE、MDA、 Fe^{2+} 水平测定

收集中性粒细胞悬液及小鼠支气管肺泡灌洗液, 依据各检测指标对应的商业试剂盒操作说明书, 分别测定样本中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)、4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及二价铁离子(Fe^{2+})的含量。

1.8 免疫荧光染色分析中性粒细胞中铁死亡标志物GPX4和PRTN3表达情况

获取1.5分组小鼠骨髓中性粒细胞, 室温下甩片机600 r/min、5 min甩片, 甲醇室温固定1 min; PBS洗5 min, 用含0.2% Triton-100的PBS室温通透30 min, 加入PBS洗5 min(3次), 用5%山羊血清室温封闭1 h; 加入1:500稀释的抗PRTN3抗体(Abcam公司)或1:100稀释的抗GPX4抗体(Abcam公司) 200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入PBS洗5 min, 加入1:500稀释的荧光二抗抗体室温避光孵育1.5 h, 使用DAPI荧光复染, 室温避光孵育5 min, 加入PBS洗5 min(3次), 使用封片剂封片, 避光晾干。置于转盘式共聚焦显微镜(UltraVIEW VOX)下观察。

1.9 qRT-PCR检测肺组织铁死亡相关基因Hepcidin、Slc7a11、Gpx4, 炎症因子Tnf- α 、Il-6及Prtn3 mRNA表达情况

取1.2分组的肺组织样本, 采用Trizol法进行总RNA的提取。使用紫外分光光度计测定260 nm波长下RNA样品的浓度, 同时通过 D_{260}/D_{280} 值评估RNA纯度。用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad公司, 1708891)合成cDNA, 采用SYBR Green定量RT-PCR试剂盒(Bio-Rad公司, 1708880)进行qRT-PCR。qRT-PCR检测Hepcidin、Slc7a11、Gpx4、Prtn3的表达水平。Hepcidin的上游引物为5'-TTG CGA TAC CAA TGC AGA AG-3', Hepcidin的下游引物为5'-TGC AAC AGA TAC CAC ACT GG-3'; Slc7a11的上游引物为5'-CTC TCT TTA CTC GGA CCC ATT C-3', Slc7a11的下游引物为5'-TTG GGT TTC TTG TCC CAT ACA-3'; Gpx4的上游引物为5'-CCG ATA TGC TGA GTG TGG TTT A-3', Gpx4的下游

引物为5'-GGC TGC AAA CTC CTT GAT TTC-3'; Prtn3的上游引物为5'-CCC TGA TCC ACC CGA GAT TC-3', Prtn3的下游引物为5'-GGT TCT CCT CGG GGT TGT AA-3'; Tnf- α 的上游引物为5'-GGT GCC TAT GTC TCA GCC TCT T-3', Tnf- α 的下游引物为5'-GCC ATA GAA CTG ATG AGA GGG AG-3'; Il-6的上游引物为5'-ACC GCT ATG AAG TTC CTC TCT GCA-3', Il-6的下游引物为5'-AAG CCT CCG ACT TGT GAA GTG GT-3'; β -Actin的上游引物为5'-AAA TCG TGC GTG ACA TCA AAG A-3', β -Actin的下游引物为5'-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'。

1.10 流式分析中性粒细胞凋亡情况

从8至12周龄的野生型小鼠骨髓中分离中性粒细胞, 调整细胞悬液浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 随后, 分别给予不同浓度梯度(3 $\mu\text{mol/L}$ 、7 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)的RSL3处理, 同时设立溶剂对照组, 细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育4 h后, 以2 000 r/min室温离心5 min收集细胞沉淀。随后用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS缓冲液洗涤细胞2次, 每次洗涤后于室温条件下以2 000 r/min离心5 min, 重悬于500 μL 结合缓冲液中, 轻吹制备单细胞悬液。加入5 μL Annexin V-APC及5 μL 7-AAD染料, 轻柔混匀后于室温避光条件下孵育5~10 min。最后, 使用流式细胞仪在染色后1 h内完成细胞凋亡率的检测分析。

1.11 统计学方法

统计分析数据借助GraphPad Prism 8软件完成, 采用独立样本Student t 检验来评估组间统计学差异。以 $P < 0.05$ 作为判定统计学显著性的标准。

2 结果

2.1 Prtn3缺乏提高了LPS诱导的脓毒症小鼠的存活率

为探究Prtn3在LPS诱导的脓毒症相关急性肺损伤中的调控机制, 本研究选取8周龄野生型(WT)及Prtn3基因敲除($\text{Prtn3}^{-/-}$)小鼠各12只, 采用腹腔注射50 mg/kg LPS建立动物模型, 建模6 h后, 系统观察并记录实验动物的行为学特征及生存情况。实验结果显示: WT对照组与 $\text{Prtn3}^{-/-}$ 对照组小鼠在活动度、摄食量及呼吸频率等方面均保持稳定, WT+LPS组小鼠出现精神萎靡、进水进食量减少、寒战、呼吸急促、毛发无光泽, 而 $\text{Prtn3}^{-/-}$ +LPS组小鼠上述症状

较轻。与WT组小鼠相比, *Prtn3*的缺失显著提高了LPS诱导的脓毒症小鼠的存活率(图1A)。HE结果显示, WT组、*Prtn3*^{-/-}组肺组织未发现明显损伤, 肺组织与支气管管腔结构完整, 在肺泡或间质中未观察到明显炎症浸润(图1B)。WT+LPS组呈现典型的急性肺损伤特征, 包括肺泡壁增厚、间质水肿及大量炎性细胞浸润, 肺损伤的Smith评分显著升高(图1B和图1C); 与WT+LPS组相比, *Prtn3*^{-/-}+LPS组表现出肺部炎症较轻、炎症渗出较少、肺泡壁增厚较轻、透明膜形成减少, Smith评分的升高也有所缓解(图1B和图1C)。这些研究结果表明, *Prtn3*在LPS诱导的脓毒症相关的肺损伤进程中可能起着较为显著的促进作用。

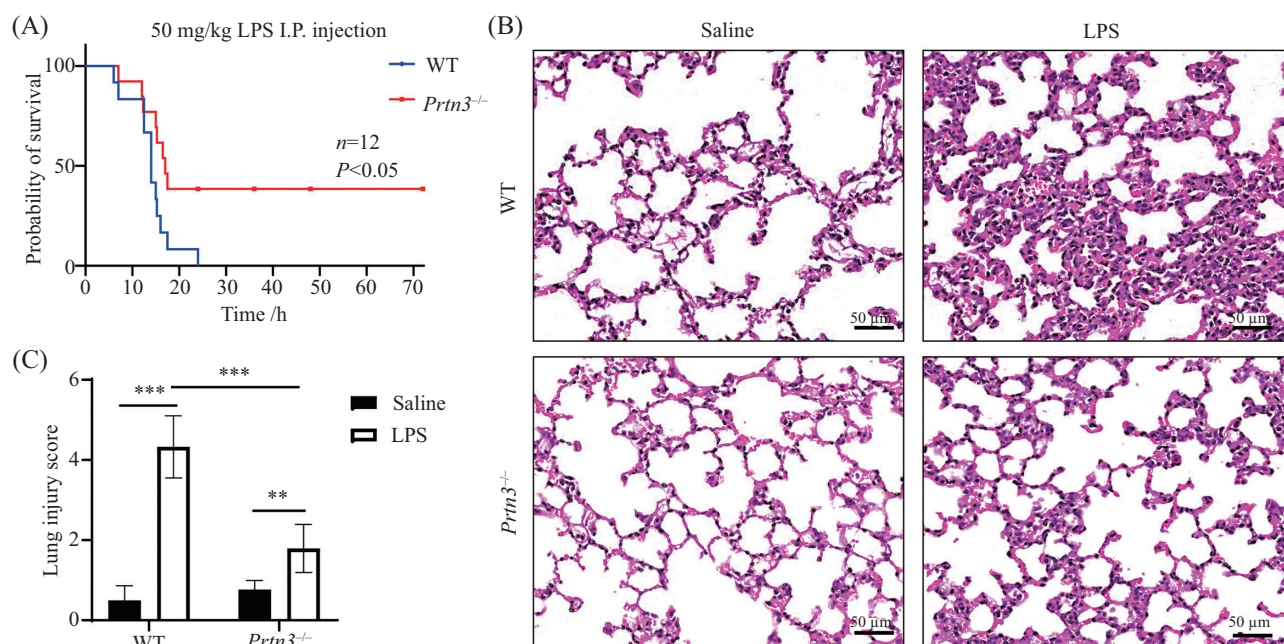
2.2 *Prtn3*的缺失抑制LPS诱导的炎症反应和细胞死亡

采用腹腔注射LPS(10 mg/kg)建立小鼠脓毒症模型。造模16 h后, 收集各组小鼠BALF, 检测其中总蛋白含量、总细胞计数及中性粒细胞与淋巴细胞的数量变化。实验数据表明, 与WT对照组、*Prtn3*^{-/-}对照组相比, LPS处理显著提升了WT实验组BALF中总蛋

白浓度和细胞总数($P<0.05$), 同时中性粒细胞和淋巴细胞的比例明显上升($P<0.05$); 与LPS处理的WT组相比, *Prtn3*^{-/-}+LPS组的BALF中总蛋白水平和细胞总数较低($P<0.05$), 中性粒细胞与淋巴细胞的比例上升趋势得到明显缓解($P<0.05$)。进一步对肺组织炎症因子检测发现, 肿瘤坏死因子 α (*Tnf- α*)和白介素6(*Il-6*)在WT+LPS组肺组织中呈现高表达状态, 而*Prtn3*^{-/-}+LPS组中这两种炎症因子的表达水平均显著低于WT+LPS组($P<0.05$)(图2)。上述研究结果表明, *Prtn3*基因缺失能够有效抑制LPS诱发的炎症反应和细胞死亡。

2.3 *Prtn3*通过调控铁死亡的方式来影响LPS诱导的细胞死亡

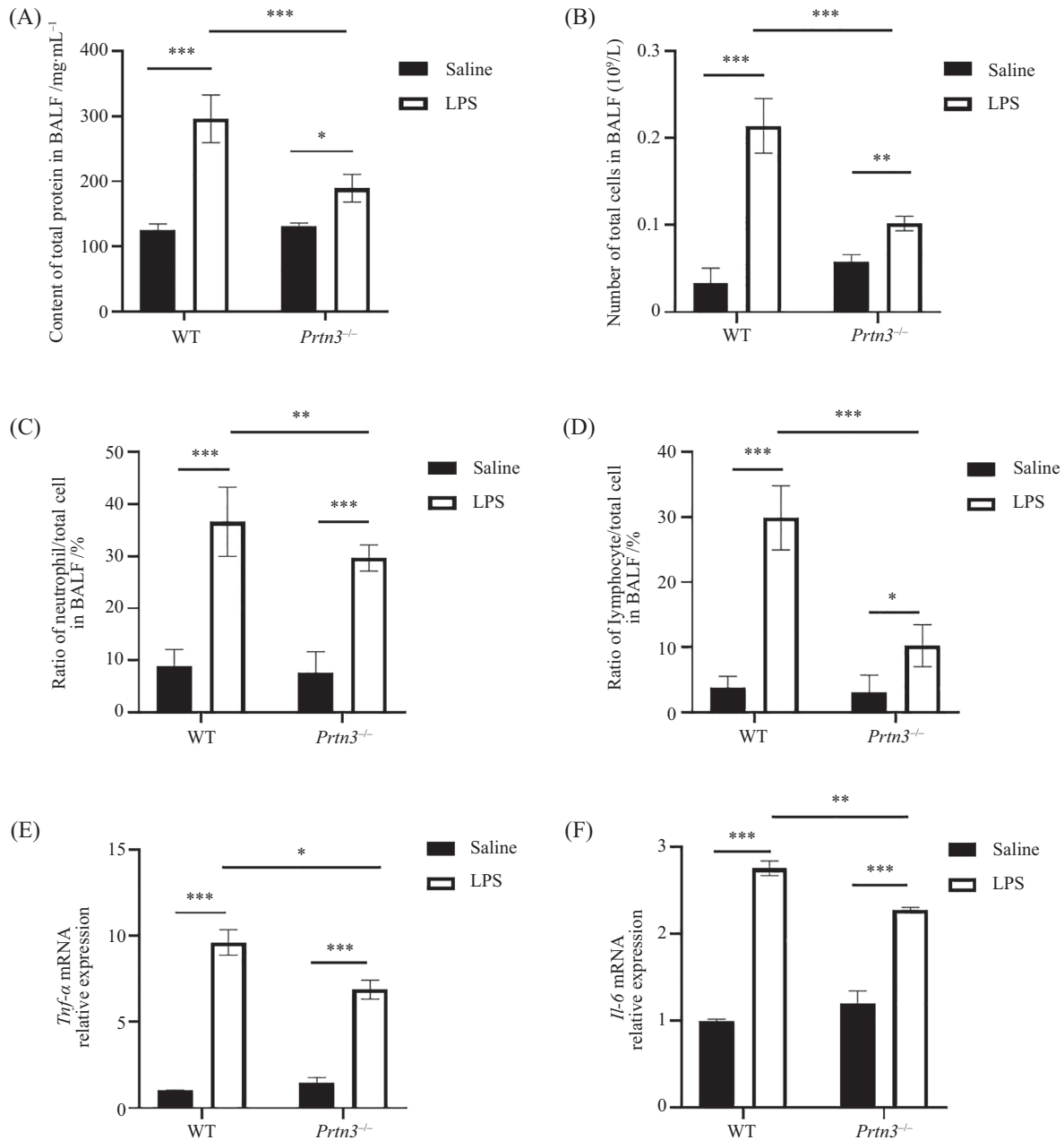
为了研究*Prtn3*基因敲除如何抑制LPS诱导的细胞损伤, 我们分析了肺泡灌洗液细胞内脂质过氧化产物含量和灌洗液细胞内 Fe^{2+} 浓度。结果显示: 与WT对照组小鼠相比, LPS作用导致WT小鼠细胞内4-HNE、铁离子水平、MDA含量均明显增加($P<0.05$)(图3A~图3C); *Prtn3*^{-/-}+LPS组肺泡灌洗液细胞中铁死亡标志物4-HNE、MDA含量和铁水平明显低于WT+LPS组($P<0.05$)。以上结果表



A: 50 mg/kg LPS腹腔注射诱导小鼠脓毒症后各组小鼠生存率。I.P.: 腹腔注射。B: 各组小鼠肺组织切片HE染色观察肺组织病理学变化。C: 各组小鼠的肺损伤Smith评分比较。*** $P<0.001$ 。

A: mouse survival rates were measured after inducing sepsis with intraperitoneal injection of 50 mg/kg LPS. I.P.: intraperitoneal injection. B: lung tissue sections of mice with 50 mg/kg LPS administration in each group were stained with HE to observe lung histopathological changes; C: comparison of Smith score of lung injury in each group of mice. *** $P<0.001$.

图1 *Prtn3*缺乏对LPS诱导的小鼠脓毒症的影响
Fig.1 Effect of *Prtn3* deficiency on LPS-induced sepsis in mice



A~D: 各组小鼠肺泡灌洗液中总蛋白、总细胞数、中性粒细胞比例、淋巴细胞比例检测。E、F: 在转录水平检测各组小鼠肺组织中*Tnf-α*、*Il-6*表达情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A~D: detection of total protein, total cell count, proportion of neutrophils and lymphocytes in BALF of mice in each group. E,F: the expression of inflammatory factors (*Tnf-α*, *Il-6*) in lung tissues of mice in each group was detected by transcription level. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 *Prtn3*的缺乏抑制了LPS诱导的炎症反应和细胞死亡

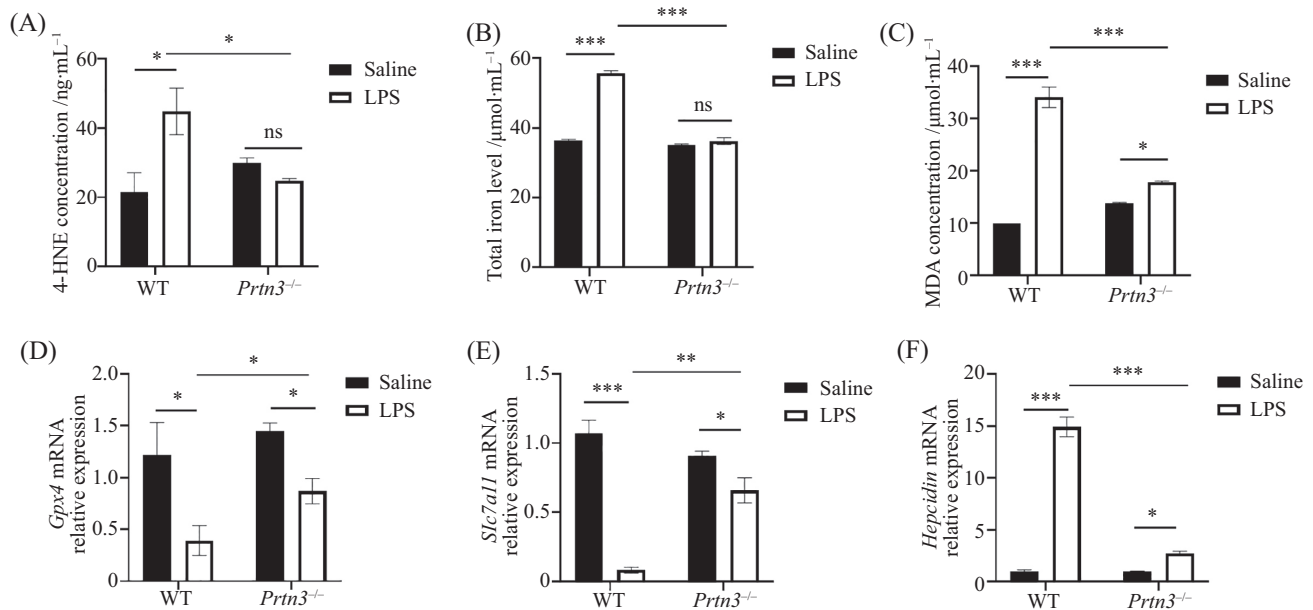
Fig.2 Deficiency of *Prtn3* inhibits LPS-induced inflammation and cell death

明, *Prtn3*参与了LPS诱导的铁死亡过程。随后的小鼠肺组织中铁死亡相关基因的表达检测结果显示: LPS处理的小鼠肺组织中两种铁死亡标志物*Gpx4*、*Slc7a11*表达水平下降, 且*Prtn3*敲低后, LPS处理组的*Gpx4*、*Slc7a11* mRNA表达水平明显高于WT+LPS组($P<0.05$)。相较于WT组, WT+LPS组肺组织中的*Hepcidin*表达水平显著上升, 然而, 在

*Prtn3*基因敲除小鼠中, LPS诱导的*Hepcidin*表达上升的趋势受到明显抑制($P<0.05$)(图3D~图3F)。这一发现提示, *Prtn3*可能通过影响SLC7A11/GPX4抗氧化信号通路参与铁死亡过程的调控机制。

2.4 *Prtn3*缺失抑制了中性粒细胞铁死亡

在脓毒症的早期阶段, 中性粒细胞作为先天免疫系统的主要效应细胞, 被认为是介导宿主组织损



A~C: 各处理组小鼠肺泡灌洗液中4-HNE含量、总铁水平、MDA水平。D~F: qRT-PCR分析小鼠肺组织中铁死亡相关基因(*Gpx4*、*Slc7a11*、*Hepcidin*)的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$ 。

A~C: 4-HNE content, total iron level and MDA level in BALF of mice in each treatment group. D~F: the expression of ferroptosis related genes (*Gpx4*, *Slc7a11*, *Hepcidin*) in mouse lung tissues was analyzed by qRT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$ 。

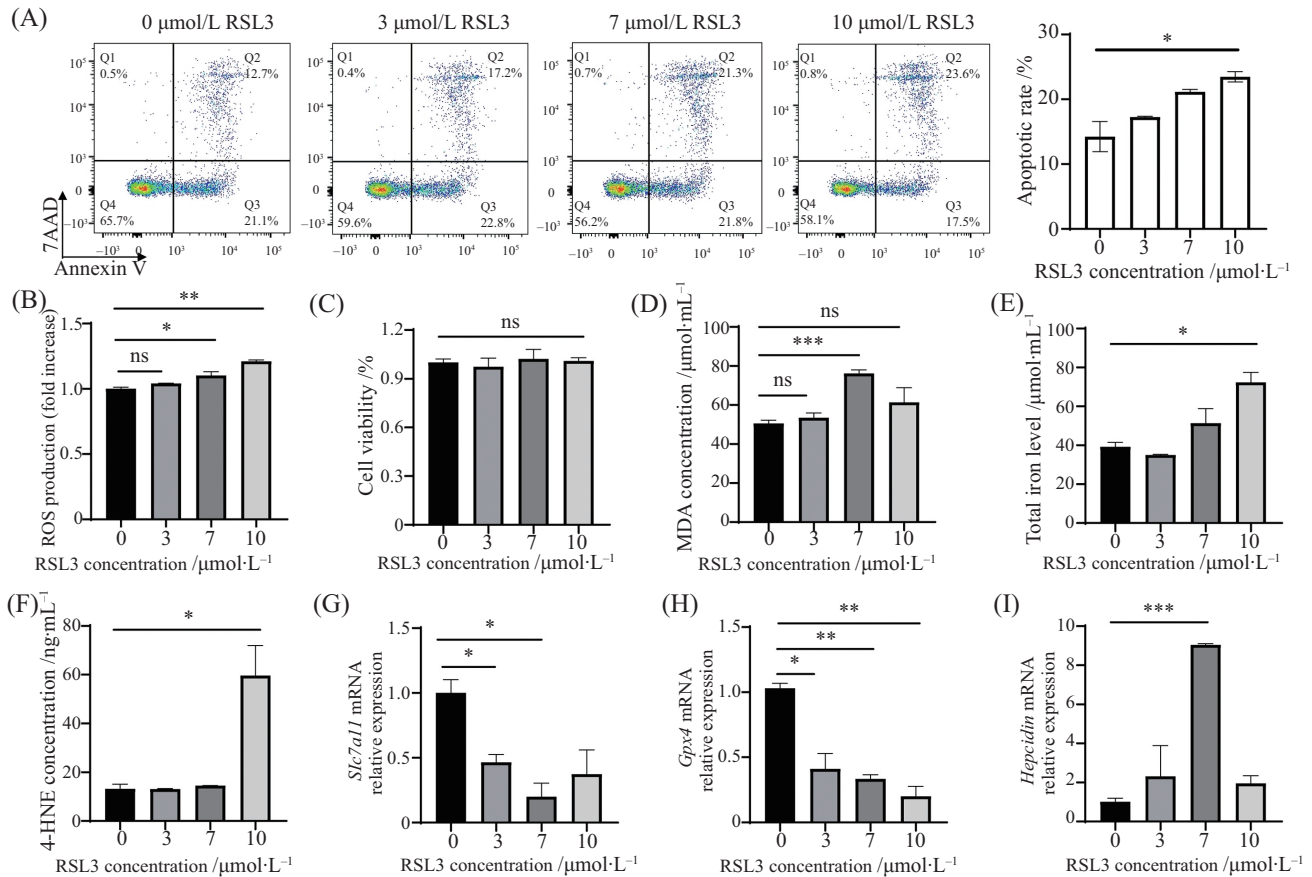
图3 *Prtn3*通过铁死亡方式调控LPS诱导的细胞死亡

Fig.3 *Prtn3* regulates LPS-induced cell death through ferroptosis

伤的关键因素。此前, LPS处理的WT小鼠肺组织的HE结果显示, 肺泡及间质中可见大量中性粒细胞浸润, 同时, 小鼠肺泡灌洗液检测结果也表明相较于WT组, WT+LPS组中性粒细胞比例显著增加, 这提示我们, LPS处理可能诱导了小鼠体内一些中性粒细胞发生铁死亡。为此, 我们首先采用不同浓度的铁死亡激动剂RSL3处理WT小鼠骨髓中性粒细胞4 h, 再通过流式检测各组中性粒细胞凋亡情况, 以期明确RSL3是否可以诱导中性粒细胞铁死亡。研究结果显示: 中性粒细胞的晚期凋亡率随着RSL3浓度的升高而增加, 在RSL3浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 中性粒细胞的晚期凋亡率达到23.6%, 与对照组相比升高了近一倍(图4A); 中性粒细胞内ROS含量也呈显著上升趋势($P < 0.05$)(图4B); 同时, 各组中性粒细胞活力随着RSL3浓度的改变并无统计学差异(图4C)。与对照组相比, RSL3以剂量依赖性方式促进中性粒细胞内总铁水平、脂质过氧化产物4-HNE和MDA含量的显著增加($P < 0.05$)(图4D~图4F)。qRT-PCR结果显示, 与对照组比较, RSL3处理的中性粒细胞中铁死亡相关基因*Gpx4*、*Slc7a11*的表达水平降低, 而*Hepcidin*的表达水平升高($P < 0.05$)(图4G~图4I)。以上结果提示, RSL3可以诱导中性粒细胞发生铁死亡,

即铁死亡也是中性粒细胞死亡的一种方式。

前面的研究结果已揭示, *Prtn3*基因的表达水平变化能影响细胞内铁代谢平衡, 进而调控铁死亡相关分子标志物的表达。但*Prtn3*是否对中性粒细胞铁死亡产生影响? 为此, 我们采用RSL3处理*Prtn3*^{-/-}及WT小鼠骨髓中的中性粒细胞16 h, 而后分析细胞铁死亡相关指标, 结果显示: 与WT组相比, RSL3处理使得中性粒细胞胞内ROS含量显著增加($P < 0.05$), 而*Prtn3*^{-/-}+RSL3组ROS水平明显低于WT+RSL3组(图5A)。此外, *Prtn3*^{-/-}+RSL3组细胞内总铁水平、MDA含量和4-HNE含量显著低于WT+RSL3组(图5B~图5D); 各组中性粒细胞铁死亡相关基因mRNA和蛋白表达检测结果显示: WT+RSL3组中性粒细胞*Slc7a11*和*Gpx4* mRNA的表达量显著低于*Prtn3*^{-/-}+RSL3组($P < 0.05$)(图5E和图5F); RSL3显著抑制WT组和*Prtn3*^{-/-}组中性粒细胞*Gpx4*的蛋白表达, 而*Prtn3*^{-/-}+RSL3组*Gpx4*的表达水平高于WT+RSL3组(图5G)。此外, 在10 $\mu\text{mol/L}$ RSL3处理后, *Prtn3*^{-/-}组的中性粒细胞晚期凋亡率明显低于WT组(图5H), 并呈现时间依赖性。以上结果表明, *Prtn3*缺失能抑制RSL3诱导的中性粒细胞铁死亡。



A: 流式细胞术检测不同浓度RSL3刺激4 h后WT小鼠中性粒细胞的凋亡情况。B: 不同浓度RSL3刺激16 h后中性粒细胞的ROS含量。C: CCK-8法检测不同浓度RSL3刺激16 h后中性粒细胞的细胞活力。D-F: 各组中性粒细胞总铁、4-HNE、MDA水平。G-I: qRT-PCR分析各组中性粒细胞铁死亡相关基因(*Slc7a11*、*Gpx4*、*Hcpcidin*)的表达情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns $P>0.05$ 。

A: the apoptosis of neutrophils stimulated by different concentrations of RSL3 at 4 h was detected by flow cytometry. B: ROS levels in neutrophils after stimulation with different concentrations of RSL3 for 16 h. C: CCK-8 assay was used to detect the cell viability of neutrophils after 16 h stimulation with different concentrations of RSL3. D-F: total iron, 4-HNE, and MDA levels of neutrophils in each group. G-I: mRNA levels of ferroptosis markers *Slc7a11*, *Gpx4* and *Hcpcidin* in neutrophils in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns $P>0.05$.

图4 RSL3诱导中性粒细胞发生铁死亡

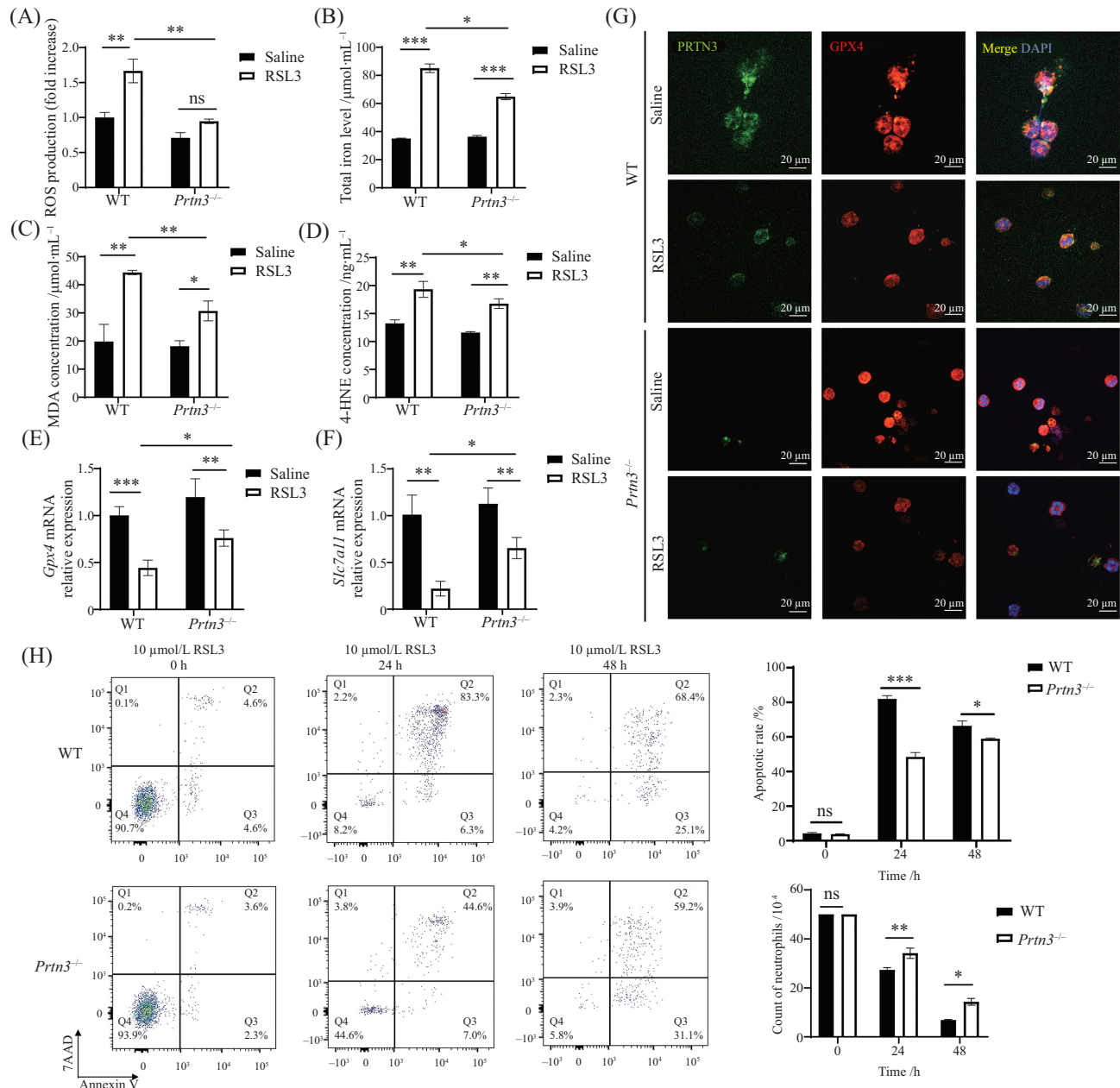
Fig.4 RSL3 induces ferroptosis in neutrophils

2.5 Fer-1促进*Prtn3*基因敲除对中性粒细胞铁死亡的影响

铁死亡抑制剂Fer-1是否可以影响*Prtn3*基因敲除对中性粒细胞铁死亡的作用? 我们的研究结果显示: *Prtn3*^{-/-}+Fer-1组的中性粒细胞活性氧含量、铁离子沉积和脂质过氧化产物(4-HNE、MDA)含量显著低于WT+Fer-1组($P<0.05$)(图6A~图6D); 各组细胞内铁死亡通路关键基因*Gpx4*和*Slc7a11*的mRNA表达检测结果显示: WT+Fer-1组中性粒细胞中*Gpx4*和*Slc7a11* mRNA表达水平显著低于*Prtn3*^{-/-}+Fer-1组($P<0.05$)(图6E和图6F); 免疫荧光结果也显示WT+Fer-1组中性粒细胞中GPX4蛋白表达水平低于*Prtn3*^{-/-}+Fer-1组(图6G)。这些结果表明, Fer-1联合*Prtn3*敲除可以显著抑制中性粒细胞的铁死亡。

2.6 初步分析*Prtn3*缺失调控铁死亡的潜在分子机制

在前面的研究中, 我们证明了*Prtn3*缺失能抑制RSL3诱导的中性粒细胞铁死亡, 但其中的潜在分子机制仍然不清楚, 为此, 我们选取4组细胞(包括RSL3不处理和处理的WT小鼠和*Prtn3*^{-/-}小鼠骨髓中性粒细胞), 培养16 h后收集细胞, 并进行基因表达谱测序。韦恩图结果显示: 与其他组相比, *Prtn3*^{-/-}+RSL3组特异性改变的基因有639个(图7A); 火山图分析显示: 与WT+RSL3组相比, *Prtn3*^{-/-}+RSL3组表达水平升高的基因有1 665个, 表达水平降低的基因有469个(图7B)。随后我们将差异基因进行GO、KEGG富集分析, 初步结果显示: 与WT+RSL3组相比, *Prtn3*^{-/-}+RSL3组中与ROS代谢途径、炎症反应、TNF信号



A: 采用ROS试剂盒检测0、7 μmol/L RSL3刺激16 h后WT组和 *Prtn3*^{-/-}组中性粒细胞细胞内ROS含量。B~D: 各组中性粒细胞中总铁水平和脂质过氧化物含量。E、F: 各组中性粒细胞铁死亡标志物*Slc7a11*、*Gpx4* mRNA水平。G: 免疫荧光染色显示WT组和*Prtn3*^{-/-}组在0和7 μmol/L RSL3刺激16 h后中性粒细胞中GPX4和PRTN3蛋白的表达水平。H: 流式细胞术检测10 μmol/L RSL3刺激后中性粒细胞细胞凋亡情况及细胞数量随时间的变化。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ^{ns}*P*>0.05。

A: ROS kit was used to detect the intracellular ROS content of neutrophils in the WT group and *Prtn3*^{-/-} group after 16 h stimulation with 0 and 7 μmol/L RSL3. B-D: the contents of total iron and lipid peroxides in neutrophils of each group. E,F: mRNA levels of ferroptosis markers *Slc7a11* and *Gpx4* in neutrophils in each group. G: immunofluorescence staining showed the expression levels of GPX4 and PRTN3 proteins in neutrophils of the WT group and *Prtn3*^{-/-} group stimulated by 0 and 7 μmol/L RSL3 for 16 h. H: the apoptosis and number of neutrophils stimulated by 10 μmol/L RSL3 with time-dependent that was detected by flow cytometry. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ^{ns}*P*>0.05.

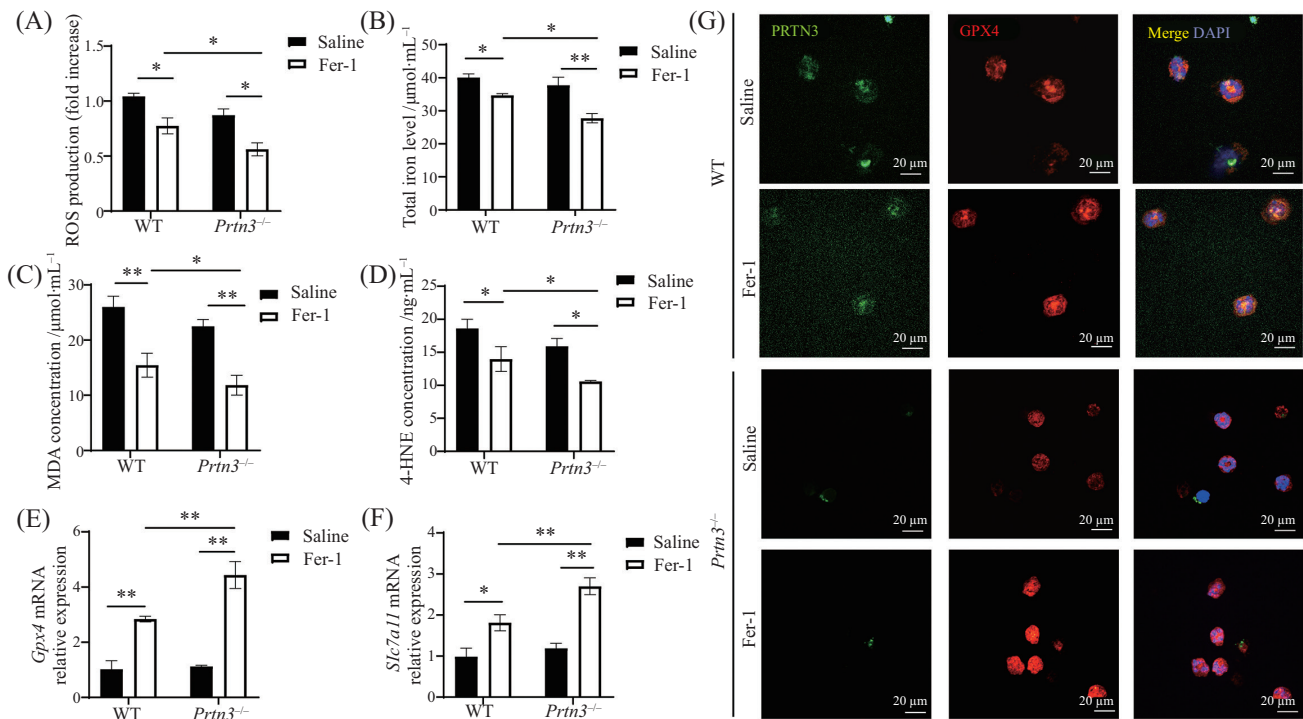
图5 *Prtn3*缺失抑制了RSL3诱导的中性粒细胞铁死亡

Fig.5 *Prtn3* deficiency inhibits RSL3-induced ferroptosis in neutrophils

通路、Toll-like receptor信号通路和NF-kappa B信号通路等相关的基因发生了显著改变,表明*Prtn3*缺失可能通过包括抗氧化途径在内的多种途径来调控铁死亡的发生(图7C)。

3 讨论

在本研究中,我们发现*Prtn3*缺失显著减轻了脓毒症相关急性肺损伤的严重程度,提高了小鼠存活率。同时,*Prtn3*缺失可能通过抗氧化途径、ROS代



A: WT组和*Prtn3*^{-/-}组在0和2 μmol/L Fer-1刺激16 h后,细胞内中性粒细胞ROS含量的变化。B~D: 各组中性粒细胞中总铁水平和脂质过氧化物含量。E、F: 各组中性粒细胞铁死亡标志物*Slc7a11*、*Gpx4* mRNA水平。G: 免疫荧光染色显示WT组和*Prtn3*^{-/-}组在Fer-1刺激16 h后中性粒细胞中GPX4和PRTN3蛋白的表达情况。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: the intracellular ROS content of neutrophils in the WT group and *Prtn3*^{-/-} group after 16 h stimulation with 0 and 2 μmol/L Fer-1. B-D: the contents of total iron and lipid peroxides in neutrophils of each group. E,F: mRNA levels of ferroptosis markers *Slc7a11* and *Gpx4* in neutrophils in each group. G: immunofluorescence staining showed the expression levels of GPX4 and PRTN3 proteins after Fer-1 stimulation of neutrophils in the WT group and *Prtn3*^{-/-} group for 16 h. **P*<0.05, ***P*<0.01.

图6 Fer-1联合*Prtn3*基因敲除对中性粒细胞铁死亡的影响

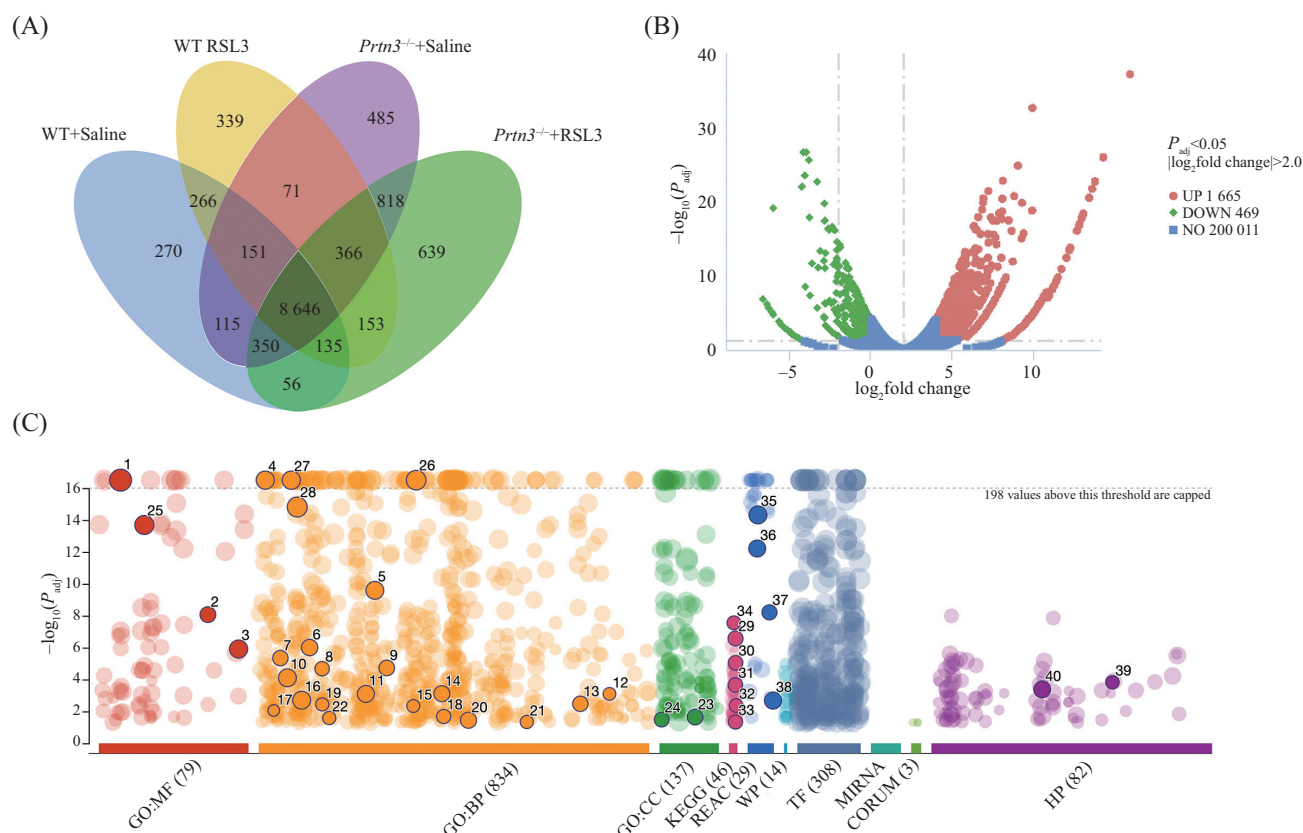
Fig.6 Effect of Fer-1 combined with *Prtn3* knockdown on ferroptosis in neutrophils

谢途径、炎症反应、TNF信号通路、Toll-like receptor信号通路和NF-kappa B信号通路等相关的基因调控中性粒细胞铁死亡,而联合*Prtn3*缺失和Fer-1可以作为一种抑制中性粒细胞铁死亡的新策略。

脓毒症通常发生在危重病人中,在全球具有极高的发病率,每年导致约3 150万人死亡。脓毒症与普通感染的根本区别在于前者由于免疫调节失衡诱发自身免疫反应,进而引发组织损伤和器官功能障碍,最终可导致多器官功能衰竭^[12]。因此,早期发现或干预异常炎症反应是有效减轻脓毒症的一种方式^[13]。脓毒症引起的急性全身炎症反应会导致不同类型的器官损伤,包括SALI和脓毒症引起的急性肝损伤(sepsis-induced acute liver injury, SiLI)^[14]。在脓毒症中,免疫系统在识别并清除大量濒死且具有潜在的免疫刺激作用的细胞的过程中发生异常免疫应答,引发自身免疫,将会促进该疾病的发展^[14]。中性粒细胞是机体中一种数量多、分布广和寿命短的天

然免疫细胞,与脓毒症的发生和发展具有密切关联。本研究发现LPS诱导的脓毒症相关急性肺损伤中的中性粒细胞可以通过铁死亡的方式发生细胞死亡,而*Prtn3*的缺失能够抑制中性粒细胞死亡,从而减轻LPS诱导的脓毒症相关急性肺损伤,进而显著提高小鼠的生存率。

铁死亡是一种非凋亡程序性细胞死亡方式,抑制SLC7A11/GPX4抗氧化系统和促进游离铁积累是诱导铁死亡的两个关键信号^[15]。铁依赖ROS的水平超过细胞的抗铁能力会激活铁死亡信号通路,导致细胞死亡^[16]。最新研究发现,铁死亡与脓毒症和脓毒症相关器官损伤的发病机制有关^[17]。脓毒症导致铁稳态失衡,包括铁转运、铁吸收增加以及铁释放减少,促进炎症信号通路的激活以及组织损伤。我们在研究中发现PRTN3是GPX4的关键调控因子,*Prtn3*基因敲除可以促进GPX4的表达上调,从而抑制SALI的发生,这与之前的研究结果一致^[18]。研究



A: 韦恩图显示7 $\mu\text{mol/L}$ RSL3刺激16 h后WT组和*Prtn3*^{-/-}组中性粒细胞的基因变化。B: 火山图显示WT+RSL3和*Prtn3*^{-/-}+RSL3组中性粒细胞的差异基因。C: 富集分析显示WT+RSL3和*Prtn3*^{-/-}+RSL3组中性粒细胞可能调控铁死亡的方式。

A: the Venn diagram revealed the gene changes in neutrophils between the WT and *Prtn3*^{-/-} groups after a 16 h stimulation with 7 $\mu\text{mol/L}$ RSL3. B: volcanic maps showed differential genes in WT+RSL3 and *Prtn3*^{-/-}+RSL3 groups of neutrophils. C: enrichment analysis revealed distinct potential ferroptosis-regulatory mechanisms in neutrophils between WT+RSL3 and *Prtn3*^{-/-}+RSL3 groups.

图7 *Prtn3*缺失调控铁死亡的潜在分子机制

Fig.7 Potential molecular mechanisms by which *Prtn3* deletion regulates ferroptosis

发现, ROS代谢途径^[19]、炎症反应^[20]、TNF信号通路^[21]、Toll-like receptor信号通路^[22]、NF-kappa B信号通路^[23]和感染发生过程^[24]中均有铁死亡的参与, 本研究也发现在诱导*Prtn3*敲除中性粒细胞的铁死亡后, 相关通路的基因表达水平也发生了显著改变, 提示*Prtn3*可能通过调控其中的关键基因参与铁死亡。然而, 潜在的分子机制仍有待深入研究。

Fer-1是一种铁死亡抑制剂^[25], 主要通过抑制脂质过氧化反应, 减少过氧化脂质的积累, 从而保护细胞免受过氧化脂质引发的细胞损伤; 此外, Fer-1可以抑制铁离子的积累和释放, 阻止过量的游离铁离子参与氧化反应, 从而减少氧化应激的发生。本研究表明, *Prtn3*基因缺失和Fer-1处理可以降低中性粒细胞的铁死亡水平, 减轻脓毒症相关急性肺损伤, 然而, 具体的分子机制仍需进一步研究。值得注意的是, 本研究发现*Prtn3*缺失阻止了与铁死亡相关的炎症反应发生, 提示敲低*Prtn3*与Fer-1具有协同抑制中

性粒细胞铁死亡的作用。

总之, 本研究通过将小鼠*Prtn3*基因特异敲除来探究*Prtn3*基因在脓毒症相关急性肺损伤中的作用。研究结果揭示了*Prtn3*缺失显著减轻了脓毒症相关急性肺损伤的程度, 提高了小鼠的生存率。*Prtn3*基因缺失通过抑制中性粒细胞铁死亡通路及炎性免疫应答反应, 有效减轻脓毒症相关急性肺损伤, 提示*Prtn3*基因可以作为一个新的脓毒症相关急性肺损伤治疗靶点。此外, 本研究还提示联合*Prtn3*敲降和Fer-1来抑制中性粒细胞铁死亡将是一种干预脓毒症的新策略。

参考文献 (References)

- [1] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-11.
- [2] RELJA B, COLDEWEY S M, GHEZZI P, et al. Editorial: com-

- munity series in translational insights into mechanisms and therapy of organ dysfunction in sepsis and trauma, volume II [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1215888.
- [3] KUMAR V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.
 - [4] SHAIKH S B, GORACCI C, TJITROPANOTO A, et al. Impact of aging on immune function in the pathogenesis of pulmonary diseases: potential for therapeutic targets [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2023, 17(5): 351-64.
 - [5] LEE J, SHIN D, ROH J L. Lipid metabolism alterations and ferroptosis in cancer: paving the way for solving cancer resistance [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 941: 175497.
 - [6] WANG X, WANG Y, HUANG D, et al. Astragaloside IV regulates the ferroptosis signaling pathway via the Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis to inhibit PM2.5-mediated lung injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109186.
 - [7] LEI X L, ZHAO G Y, GUO R, et al. Ferroptosis in sepsis: the mechanism, the role and the therapeutic potential [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 956361.
 - [8] COBB J K, SHIVER L, RUSSELL C R, et al. Proteinase 3 antibody and anti-double-stranded DNA in a patient with immunoglobulin light chain amyloidosis [J]. *Cureus*, 2023, 15(10): e47667.
 - [9] KARATEPE K, ZHU H, ZHANG X, et al. Proteinase 3 limits the number of hematopoietic stem and progenitor cells in murine bone marrow [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(5): 1092-105.
 - [10] LOISON F, ZHU H, KARATEPE K, et al. Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4445-58.
 - [11] AZIZ M, ODE Y, ZHOU M, et al. B-1a cells protect mice from sepsis-induced acute lung injury [J]. *Mol Med*, 2018, 24: 1-12.
 - [12] CARABALLO C, JAIME F. Organ dysfunction in sepsis: an ominous trajectory from infection to death [J]. *Yale J Biol Med*, 2019, 92(4): 629.
 - [13] POVOA P, COELHO L, DAL-PIZZOL F, et al. How to use biomarkers of infection or sepsis at the bedside: guide to clinicians [J]. *Intensive Care Med*, 2023, 49(2): 142-53.
 - [14] ZHANG H, LIU J, ZHOU Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate m⁶A modification and regulates sepsis-associated acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3337-57.
 - [15] WANG X, WANG Y, HUANG D, et al. Astragaloside IV regulates the ferroptosis signaling pathway via the Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis to inhibit PM2.5-mediated lung injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109186.
 - [16] LIU X Y, WEI D G, LI R S. Capsaicin induces ferroptosis of NSCLC by regulating SLC7A11/GPX4 signaling *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11996.
 - [17] LIU Y, TAN S, WU Y, et al. The emerging role of ferroptosis in sepsis [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(4): 368-80.
 - [18] LI P, JIANG M, LI K, et al. Glutathione peroxidase 4-regulated neutrophil ferroptosis induces systemic autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(9): 1107-17.
 - [19] FAN Y T, PENG D Q, SHEN J L, et al. Copper excess induces autophagy dysfunction and mitochondrial ROS-ferroptosis progression, inhibits cellular biosynthesis of milk protein and lipid in bovine mammary epithelial cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2025, 291: 117783.
 - [20] LIU Y, MIAO R, XIA J, et al. Infection of *Helicobacter pylori* contributes to the progression of gastric cancer through ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 485.
 - [21] ZENG F, CHEN A, CHEN W, et al. Knockout of TNF- α in microglia decreases ferroptosis and convert microglia phenotype after spinal cord injury [J]. *Heliyon*, 2024, 10(17): e36488.
 - [22] EL-KHALIK S R A, IBRAHIM R R, GHAFAR M T A, et al. Novel insights into the SLC7A11-mediated ferroptosis signaling pathways in preeclampsia patients: identifying pannexin 1 and toll-like receptor 4 as innovative prospective diagnostic biomarkers [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(5): 1115-24.
 - [23] XIE Y, YU H, YE Y, et al. Activation of ferroptosis and NF- κ B/NLRP3/MAPK pathways in methylmercury-induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol Ind Health*, 2025, 41(3): 131-9.
 - [24] LETAFATI A, TAGHIABADI Z, ARDEKANI O S, et al. Unveiling the intersection: ferroptosis in influenza virus infection [J]. *Viol J*, 2024, 21(1): 185.
 - [25] LIU P, FENG Y, LI H, et al. Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25: 1-14.