

肽基精氨酸脱亚胺酶 4 调控 IL-8 分泌参与 系统性红斑狼疮发病的研究

马洁,汪晓庆,周廷栋,罗颖,周强

(安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601)

摘要 目的 探讨肽基精氨酸脱亚胺酶 4(PADI4)对白细胞介素 8(IL-8)分泌的调控,及其对系统性红斑狼疮(SLE)发病的影响。方法 利用 qRT-PCR 对比健康对照(HC)和 SLE 患者中性粒细胞 IL-8 表达水平。ELISA 检测 HC 和 SLE 患者血清中 IL-8 分泌水平,分析狼疮患者血清 IL-8 水平与 SLE 相关血清学指标的关联性。ELISA 检测 HC 或 SLE 血清对中性粒细胞分泌 IL-8 的影响。在原代中性粒细胞中使用 PADI4 特异性抑制剂 GSK484,或在 PADI4 敲减的中性粒细胞样 HL-60 细胞(dHL-60)中检测 N-甲酰-蛋氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(fMLP)及免疫复合物(ICs)刺激下 IL-8 的分泌水平。结果 与 HC 相比,IL-8 高表达于 SLE 患者中性粒细胞。狼疮患者血清 IL-8 水平明显增高,且与血清 IgM 水平呈正相关。SLE 患者血清能够诱导中性粒细胞分泌更多 IL-8。PADI4 抑制剂能够上调中性粒细胞中 IL-8 的产生,dHL-60 细胞中,PADI4 敲减导致 IL-8 分泌显著上升。结论 促炎细胞因子 IL-8 在 SLE 患者中性粒细胞和血清中高表达,并受 PADI4 调控,与狼疮血清学指标相关。IL-8 通过炎症反应在 SLE 发生发展中发挥作用,PADI4/IL-8 为 SLE 的监测及治疗提供新思路。

关键词 系统性红斑狼疮;白细胞介素 8;肽基精氨酸脱亚胺酶 4;炎症;中性粒细胞;细胞因子

中图分类号 R 392.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1874-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.013

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种典型的慢性自身免疫病,多发病于女性,其特征为自身抗体过度产生及免疫复合物(immune complexes, ICs)介导的炎症反应。SLE 全球年发病率为 1.5~11.0/10 万人^[1],病死率是普通人群的 2~3 倍^[2]。目前尚无治愈 SLE 的方法,部分难治性患者在适当的治疗后无法获得临床缓解,易发展为终末器官损害甚至死亡,因此,亟需新的治疗策略以提高疗效并减少副作用。

IL-8 是一种强效促炎趋化因子,在肾小球肾炎和 IgA 肾病等疾病中得到了深入研究^[3]。SLE 患者循环 IL-8 水平与疾病活动性呈正相关,并与肾损伤和肺纤维化密切相关^[4]。肽基精氨酸脱亚胺酶 4(peptidylarginine deiminase 4, PADI4)主要在中性粒细胞中表达,可将精氨酸转化为瓜氨酸,介导中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)形成,参与自身免疫性疾病的发生^[5]。据文

献^[6]报道,PADI4 可促进 T 细胞中 IL-8 的转录激活。在 SLE 患者中,PADI4 是否参与调控促炎细胞因子 IL-8 的表达分泌尚不清楚。该课题利用 SLE 患者临床样本和细胞模型探讨 PADI4 调控 IL-8 表达与 SLE 发展的关系,为疾病的靶向治疗提供新见解。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2023 年 9 月—2024 年 9 月在安徽医科大学第二附属医院就诊的 SLE 患者共 55 例。入选标准:① 年满 18 岁;② 符合美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)2009 年修订的 SLE 诊断标准;③ 具有相关实验室检查资料者,包括补体 3(complement 3, C3)、补体 4(complement 4, C4)、IgG、IgA、IgM 血清学数据。排除标准:① 合并肿瘤疾病,其他自身免疫性疾病或免疫缺陷病者;② 治疗情况不详者。选取 26 例年龄与性别匹配的健康体检者作为健康对照(healthy control, HC)。

1.2 研究方法

1.2.1 中性粒细胞分离纯化 从新鲜的 EDTA 抗凝血中分离原代中性粒细胞。使用内毒素定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)检测分离和培养

2025-07-26 接收

基金项目:安徽省高校科学研究项目(编号:2024AH050787)

作者简介:马洁,女,主管技师,博士;

周强,男,主任技师,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: zhouqiang1973@163.com

过程中所用的试剂,以确保内毒素水平低于 0.5 EU/mL。将全血与等体积 PBS 混合,轻轻铺在 Ficoll-Paque Plus 溶液(GE Healthcare Life Science,瑞典)顶部,3 000 r/min 梯度离心 30 min 后,血液成分从上至下分为 5 层,包括血浆、外周血单个核细胞、Ficoll 溶液、粒细胞和红细胞。将混有红细胞的粒细胞层收集在新的离心管中,室温下与 6% 葡聚糖溶液(Sigma-Aldrich,挪威)混合并沉淀 20 min,随后将含有粒细胞的上层溶液收集到新管中。无菌去离子水裂解剩余红细胞 30 s,PBS 中和后离心,在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中培养纯化的中性粒细胞。

1.2.2 HL-60 细胞的培养和分化 HL-60 细胞系购自美国标准生物品收藏中心(American Type Culture Collection,ATCC,美国)。在整个培养期间,细胞密度保持在 1×10^6 个/mL 以下,每 2~3 天传代 1 次,实验中使用的细胞传代次数不超过 20 次。将 HL-60 细胞与 1.3% 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)孵育 5 d,细胞分化为中性粒细胞样 HL-60 细胞(neutrophil-like HL-60 cells,dHL-60)。通过流式细胞术检测 CD11b 表达及 DAPI 染色观察细胞核形态来评估 HL-60 分化水平。

1.2.3 构建 PADI4 敲低的 HL-60 细胞系 靶向 PADI4 的 shRNA(序列:GGTCCTGCTACAACTGT-TCC)和对照组 shRNA(序列:GCTTCGCGCCG-TAGTCTTA)克隆到慢病毒干扰载体 psi-LVRU6GP 中(GeneCopoeia,美国)。使用 Lipofectamine2000(Invitrogen,美国)将上述重组质粒和两个慢病毒包装载体 psPAX2 及 pMD2.G 共转染到 293T 细胞中,2 d 后收集含病毒颗粒的 293T 细胞培养上清液用于感染 HL-60 细胞。随后,流式细胞仪分选出 GFP 阳性的 HL-60 细胞,并在培养过程中用 0.2 g/mL 嘌呤霉素持续筛选。HL-60 细胞诱导分化为 dHL-60 细胞后 qRT-PCR 检测 PADI4 敲减效率。

1.2.4 qRT-PCR 实验 使用 TRIzol 试剂(Molecular Research Center Inc.,美国)提取 RNA,随后,使用 PrimeScript RT 试剂盒(Takara,日本)将 RNA 反转录为 cDNA。在 StepOnePlus 实时 PCR 系统中利用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(Takara,日本)进行 qPCR。将 GAPDH 表达水平作为内参,对基因表达进行标准化,以相对量(relative quantity,RQ)表示并通过 $2^{-[\Delta C_T(\text{测试样本}) - \Delta C_T(\text{参考样本})]}$ 公式进行计算。qPCR 引物序列如下:GAPDH(NM_002046.7,正向引物:5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3';反向引

物:5'-GATGGCATGGACTGTGCTCA-3'),IL-8(NM_000584.4,正向引物:5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3',反向引物:5'-CTCCACAACCCTCTGCAC-3')。

1.2.5 ELISA 实验 使用高敏型人 IL-8 酶联免疫吸附测定试剂盒(Elabscience,美国)检测健康对照者或 SLE 患者血清中 IL-8 分泌水平。将原代中性粒细胞或 dHL-60 细胞与 100 nmol/L N-甲酰-蛋氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formyl-met-leu-phe,fMLP)(SigmaAldrich,美国)、健康对照者血清、SLE 患者血清或 SLE 血清衍生 ICs 共培养 24 h,使用上述 IL-8 检测试剂盒测量培养上清液中 IL-8 分泌水平。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 软件(GraphPad Software Inc.,美国)分析数据。进行统计分析前,通过 Shapiro-Wilk 检验对数据的正态分布进行检验。数据遵循正态分布时,采用 t 检验或配对 t 检验。如果数据不服从正态分布,则使用 Mann-Whitney U 检验或 Spearman 相关性分析。多组间比较使用 Ordinary One-Way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 入选 SLE 患者 55 例,平均年龄 41 岁,健康对照 26 例,平均年龄 44 岁,两组研究者间性别年龄相匹配,差异无统计学意义(表 1)。SLE 患者血清学实验室检测指标 C3、C4、IgG、IgA 及 IgM 水平见表 1。

表 1 研究参与者的人口统计学和临床特征($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Demographic and clinical characteristics of study participants ($\bar{x} \pm s$)

Study group	Healthy control ($n=26$)	SLE patients ($n=55$)
Male : Female	3 : 23	7 : 48
Age (year)	44 ± 14	41 ± 14
C3 (g/L)	/	0.87 ± 0.31
C4 (g/L)	/	0.24 ± 0.16
IgG (g/L)	/	14.33 ± 4.47
IgA (g/L)	/	2.16 ± 1.03
IgM (g/L)	/	1.55 ± 2.78

2.2 促炎细胞因子 IL-8 表达情况 中性粒细胞可自发分泌促炎细胞因子 IL-8,qRT-PCR 结果显示,SLE 患者中性粒细胞 IL-8 的基础 mRNA 表达水平明显高于 HC(图 1A)。同时,SLE 患者血清 IL-8 基础分泌水平显著高于 HC(图 1B)。

2.3 血清 IL-8 水平与 SLE 血清学指标相关性分析 SLE 患者血清 IL-8 水平与血清补体 C3、C4 及

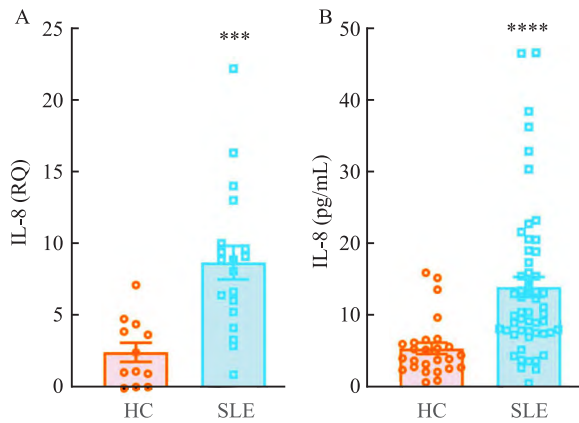


图1 HC和SLE患者中IL-8表达情况

Fig.1 The expression of IL-8 in HC and SLE patients

A: Relative expression of IL-8 in neutrophils from HC ($n=12$) and SLE patients ($n=19$); RQ: relative quantification; B: IL-8 expression level in sera of HC ($n=26$) and SLE patients ($n=55$); *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs HC group.

IgG、IgA水平无线性相关($C3:r = -0.17, P = 0.23$; $C4:r = 0.06, P = 0.69$; $IgG:r = -0.11, P = 0.42$; $IgA:r = -0.15, P = 0.26$) (图2A-2D), 与血清IgM水平呈正相关($IgM:r = 0.54, P < 0.0001$) (图2E)。

2.4 血清诱导中性粒细胞分泌IL-8情况 狼疮患者血清中某些因子能够诱导炎症反应。与未刺激组及健康对照组血清相比, SLE患者血清能够刺激中性粒细胞分泌更多的促炎细胞因子IL-8 (图3A)。

2.5 PADI4抑制剂GSK484影响中性粒细胞分泌IL-8情况 细菌衍生肽fMLP和SLE血清来源的ICs能够在体外刺激中性粒细胞释放IL-8。PADI4特异性抑制剂GSK484显著上调了fMLP和ICs诱导的IL-8的分泌 (图3B、3C)。

2.6 PADI4敲减的中性粒样HL-60细胞分泌IL-8情况 鉴于PADI4抑制剂GSK484增加了原代中性粒细胞中fMLP和ICs诱导的IL-8的释放, 在dHL-60

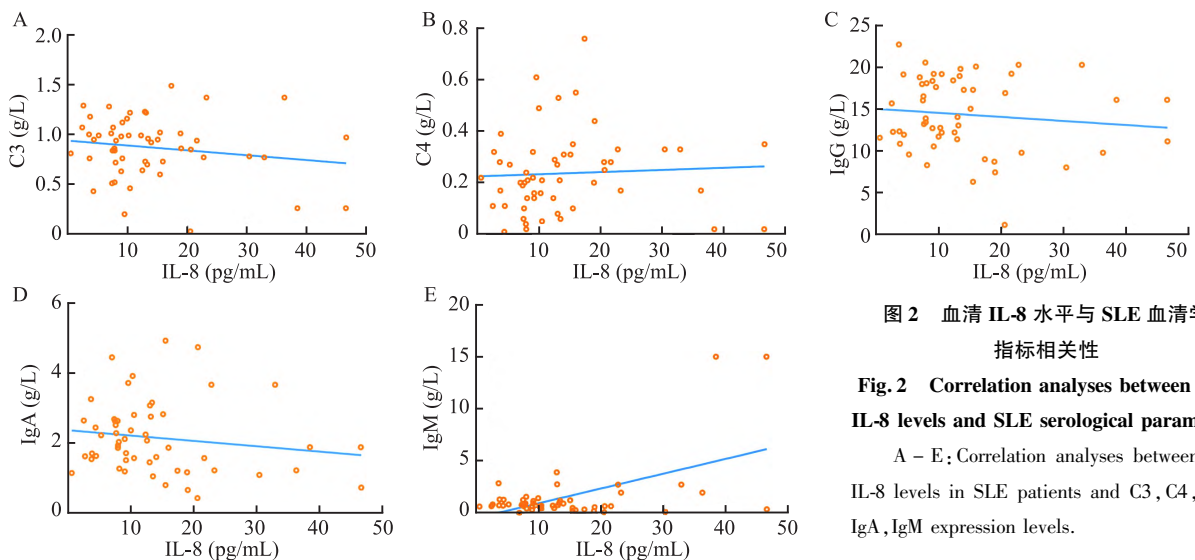


图2 血清IL-8水平与SLE血清学指标相关性

Fig.2 Correlation analyses between sera IL-8 levels and SLE serological parameters

A-E: Correlation analyses between sera IL-8 levels in SLE patients and C3, C4, IgG, IgA, IgM expression levels.

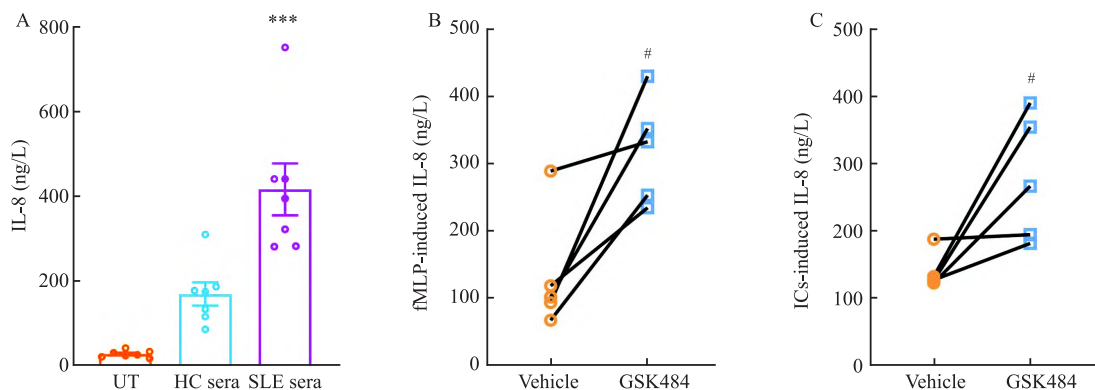


图3 中性粒细胞分泌IL-8情况

Fig.3 Secretion levels of IL-8 in neutrophils

A: IL-8 secretion levels of neutrophils induced by HC and SLE sera, UT: Unstimulated group; B: After pretreatment with Vehicle or GSK484, IL-8 secretion level in fMLP induced neutrophils; C: After pretreatment with Vehicle or GSK484, IL-8 secretion level in ICs induced neutrophils; *** $P < 0.001$ vs HC sera group; # $P < 0.05$ vs Vehicle group.

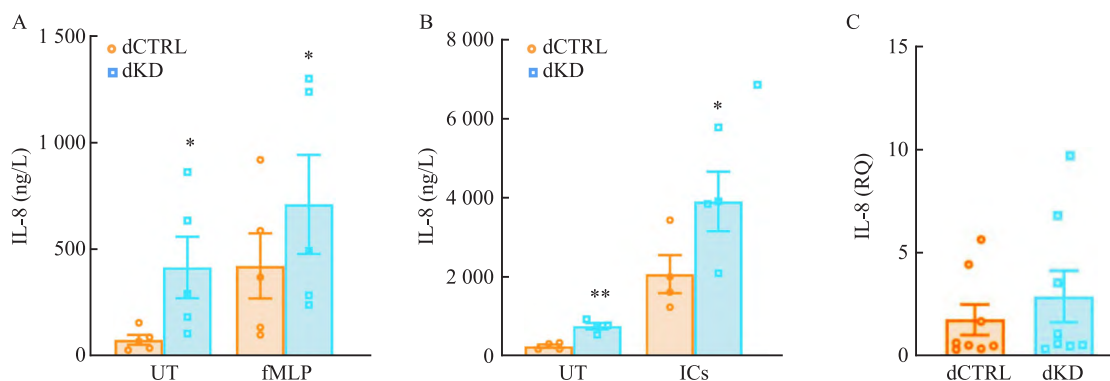


图4 PADI4 敲减的 dHL-60 分泌 IL-8 情况

Fig. 4 IL-8 secretion levels in PADI4-knockdown dHL-60 cells

A: IL-8 secretion levels in fMLP induced dCTRL and dKD cells; B: IL-8 secretion levels in ICs induced dCTRL and dKD cells; C: Relative mRNA expression of IL-8 in dCTRL ($n=8$) and dKD ($n=8$) cells, RQ: relative quantification; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs dCTRL group.

细胞中进一步研究 PADI4 对 IL-8 分泌的调节。在没有任何刺激的情况下, PADI4 敲低的 dHL-60 细胞 (dKD) 中 IL-8 的基础分泌水平高于乱序对照组 (dCTRL); fMLP 或 ICs 刺激后, dKD 细胞中 IL-8 分泌增多 (图 4A、4B)。如图 4C 所示, PADI4 缺乏对 IL-8 的 mRNA 表达没有显著影响。

3 讨论

SLE 发病机制复杂, 治疗手段有限且难以治愈, 对患者及其家庭和社会产生广泛影响。现阶段治疗的策略主要是通过羟氯喹、皮质类固醇激素、免疫抑制剂和生物制剂等药物抑制症状^[7], 缓解或降低疾病活动度, 以限制活动状态下的器官损伤, 减少继发性并发症。尽管单独或联合使用上述药物可以有效控制 SLE, 但许多患者仍会面临病情复发、长期并发症及药物副作用的困扰, 急需开发潜在治疗靶点^[8]。因此, SLE 发病机制的深入研究有望为临床上提供新的狼疮防治策略。

细胞因子表达失调是 SLE 的典型特征, 促炎和抗感染细胞因子产生不平衡, 免疫细胞对各种细胞因子的异常反应, 加剧免疫失调, 导致 SLE 中组织炎症和器官损伤^[9]。SLE 中促炎细胞因子的异常表达影响疾病活动性, 有文献^[10]报道血清 IL-6、IL-8 和 IL-18 水平有潜力作为临床上监测 SLE 疾病活动性的指标。本研究中, 相较于健康对照, SLE 中性粒细胞高表达促炎细胞因子 IL-8, SLE 患者血清 IL-8 水平显著高于对照血清, 且与血清 IgM 水平呈正相关, 表明 IL-8 与 SLE 发生发展有密切关联。IL-8 水平升高在多种肾脏疾病中被报道, 包括 IgA 肾病、急性肾小球肾炎和 SLE 性肾炎^[11]。IL-8 能够募集中

性粒细胞至炎症部位, 促进 NETs 形成激活中性粒细胞释放新的表位^[12], 进而参与 SLE 的发生发展。动物模型中, 施用抗 IL-8 抗体可预防蛋白尿、减轻中性粒细胞在肾小球中的浸润并改善小鼠肾小球损伤程度^[13]。以上结果提示 IL-8 可能作为疾病监测和治疗的靶点。

PADI4 被认为能够调节促炎细胞因子的产生^[14]。PADI4 通过对 NF- κ B p65 亚基进行瓜氨酸化可增强中性粒细胞中 p65 与 importin α 3 之间的结合, 从而增加 NF- κ B 核转位率以及 TLR 诱导的 IL-1 β 和 TNF- α 产生^[15]。PADI4 还可促进 T 细胞中 IL-8 的转录激活。据报道, PADI 对 TNF- α 进行瓜氨酸化会降低其在体外刺激人成纤维细胞分泌 IL-8 的能力^[16]。本研究表明, PADI4 特异性抑制剂 GSK484 显著上调了 fMLP 和 SLE 血清来源的 ICs 诱导的中性粒细胞 IL-8 的分泌。同时, 在细胞模型中, 与乱序对照相比, 未刺激或 fMLP、ICs 刺激的 PADI4 敲减 dHL-60 细胞均分泌更多的 IL-8, 这表明 PADI4 活性可能调节 SLE 中 IL-8 的产生。PADI4 的瓜氨酸化活性已被证明可以抑制蛋白质相互作用和聚集^[17]。据报道, PADI4 能够在体外瓜氨酸化 IL-8, 并降低 IL-8 的趋化活性^[18]。PADI4 可能通过调控染色质可及性影响 IL-8 表达水平, 也可能通过调节其他蛋白质功能参与中性粒细胞中 IL-8 的转录后加工与分泌, 具体机制尚待探索。

综上所述, 本课题通过对临床样本和细胞模型的分析显示, PADI4 调节 SLE 中促炎细胞因子 IL-8 的表达, 为 SLE 发病机制及干预手段提供新思考。

参考文献

- [1] Barber M R W, Drenkard C, Falasinnu T, et al. Global epidemi-

- ology of systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(9): 515–32. doi:10.1038/s41584-021-00668-1.
- [2] Zen M, Salmaso L, Barbiellini Amidei C, et al. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus over the last decade: data from a large population-based study[J]. *Eur J Intern Med*, 2023, 112: 45–51. doi:10.1016/j.ejim.2023.02.004.
- [3] Haroun R A, Abdel Noor R A. Association of IL-8-251T/A (rs4073) gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in a cohort of Egyptian patients[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109528. doi:10.1016/j.intimp.2022.109528.
- [4] Park J, Jang W, Park H S, et al. Cytokine clusters as potential diagnostic markers of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(6): 0300060520926882. doi:10.1177/0300060520926882.
- [5] Liu X, Arfman T, Wichapong K, et al. PAD4 takes charge during neutrophil activation: impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease[J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19(7): 1607–17. doi:10.1111/jth.15313.
- [6] Sharma P, Azebi S, England P, et al. Citrullination of histone H3 interferes with HP1-mediated transcriptional repression[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(9): e1002934. doi:10.1371/journal.pgen.1002934.
- [7] 王 钢, 李向培. 糖皮质激素在系统性红斑狼疮目标治疗中的应用进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(11): 1739–43. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.035.
- [7] Wang G, Li X P. Application progress of glucocorticoid in targeted therapy of systemic lupus erythematosus[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2017, 52(11): 1739–43. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.035.
- [8] Lazar S, Kahlenberg J M. Systemic lupus erythematosus: new diagnostic and therapeutic approaches[J]. *Annu Rev Med*, 2023, 74: 339–52. doi:10.1146/annurev-med-043021-032611.
- [9] Xiang M, Wang Y, Gao Z, et al. Exploring causal correlations between inflammatory cytokines and systemic lupus erythematosus: a Mendelian randomization [J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 985729. doi:10.3389/fimmu.2022.985729.
- [10] Zhi L, Gu L, Tong L, et al. Immune profile alterations of systemic lupus erythematosus patients with infections[J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23(8): 4765–77. doi:10.1007/s10238-023-01220-z.
- [11] Pillebout E, Jamin A, Ayari H, et al. Biomarkers of IgA vasculitis nephritis in children[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188718. doi:10.1371/journal.pone.0188718.
- [12] Zou J, Zhao Z, Song X, et al. Elevated G-CSF, IL8, and HGF in patients with definite Meniere's disease may indicate the role of NET formation in triggering autoimmunity and autoinflammation [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 16309. doi:10.1038/s41598-022-20774-8.
- [13] Wada T, Tomosugi N, Naito T, et al. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(3): 1135–40. doi:10.1084/jem.180.3.1135.
- [14] Okamoto Y, Ghosh T, Okamoto T, et al. Subjects at-risk for future development of rheumatoid arthritis demonstrate a PAD4-and TLR-dependent enhanced histone H3 citrullination and proinflammatory cytokine production in CD14(hi) monocytes[J]. *J Autoimmun*, 2021, 117: 102581. doi:10.1016/j.jaut.2020.102581.
- [15] Sun B, Dwivedi N, Bechtel T J, et al. Citrullination of NF- κ B p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1 β and TNF α [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(12): eaal3062. doi:10.1126/sciimmunol.aal3062.
- [16] Moelants E A V, Mortier A, Grauwen K, et al. Citrullination of TNF- α by peptidylarginine deiminases reduces its capacity to stimulate the production of inflammatory chemokines[J]. *Cytokine*, 2013, 61(1): 161–7. doi:10.1016/j.cyt.2012.09.011.
- [17] Proost P, Loos T, Mortier A, et al. Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 2085–97. doi:10.1084/jem.20080305.
- [18] Chen S H, Lv Q L, Hu L, et al. DNA methylation alterations in the pathogenesis of lupus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 187(2): 185–92. doi:10.1111/cei.12877.

Peptidylarginine deiminase 4 regulates IL-8 secretion involves in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

Ma Jie, Wang Xiaoqing, Zhou Tingdong, Luo Ying, Zhou Qiang

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the regulation of interleukin 8 (IL-8) secretion by peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and its effect on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** qRT-PCR was used to compare the expression levels of IL-8 in neutrophils between healthy controls (HC) and SLE patients. ELISA was used to detect IL-8 secretion levels in the serum of HC and SLE patients, the correlation between serum IL-8 and SLE related serological indicators in lupus patients was analyzed. ELISA was used to detect the effect of HC or

(下转第 1886 页)

Establishment of the EMT model of CoCl₂-induced NRK-52E cells

Ni Lei, Sun Qingqing, Cheng Jiangrui, Wei Wei, Wang Chun

(School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To establish an *in vitro* cell model of Cobalt dichloride (CoCl₂)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E). *Methods* NRK-52E cells were cultured *in vitro* and randomly divided into a blank control group (NC group) and a CoCl₂ treatment group. The CoCl₂ treatment group underwent 1, 2, 3, and 4 cycles of treatment, with each cycle consisting of CoCl₂ treatment for 9 h followed by recovery in CoCl₂-free medium for 3 h. The optimal concentration and time of CoCl₂-induced EMT were screened using the CCK-8 assay. Morphological changes in cells were observed using light microscopy and phalloidin staining. The expression levels of EMT marker proteins were detected by Western blot and immunofluorescence. *Results* Compared with the NC group, stimulation by 100 μmol/L CoCl₂ for 48 h significantly induced apoptosis ($P < 0.01$), meeting the requirements for subsequent experiments. Western blot results showed that the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and α-smooth muscle actin (α-SMA) significantly increased in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h ($P < 0.001$), indicating the most pronounced fibrotic response. Observations under light microscopy and rhodamine-labeled phalloidin staining revealed that the morphological changes and cytoskeletal rearrangement of NRK-52E cells were most significant in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h, demonstrating the best model stability. Immunofluorescence results showed that compared with the NC group, the fluorescence intensity of the fibrous matrix protein Collagen I significantly increased in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h ($P < 0.001$). *Conclusion* The protocol involves treating NRK-52E cells with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h, following 3 h of recovery in CoCl₂-free medium. Repeating this cycle three times can establish an *in vitro* EMT model.

Key words NRK-52E cells; Cobalt(II) dichloride; epithelial-mesenchymal transition; hypoxia-inducible factor-1α; α-smooth muscle actin

Fund program Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 2023s07020003)

Corresponding author Wang Chun, E-mail: wangchun@ahmu.edu.cn

(上接第 1878 页)

SLE serum on IL-8 secretion by neutrophils. Using PADI4-specific inhibitor GSK484 in primary neutrophils, or in PADI4-knockdown neutrophil-like HL-60 cells (dHL-60), IL-8 stimulated by N-formyl-met-leu-phe (fMLP) or immune complexes (ICs) was detected. *Results* Compared with HC, IL-8 was significantly higher expressed in neutrophils of SLE patients. Serum IL-8 levels significantly increased in lupus patients and were positively correlated with serum IgM levels. Serum from SLE patients induced neutrophils to secrete more IL-8. PADI4 inhibitor could upregulate the production of IL-8 in neutrophils. In dHL-60 cells, knockdown of PADI4 led to a significant increase in IL-8 secretion. *Conclusion* The proinflammatory cytokine IL-8 is highly expressed in neutrophils and serum of SLE patients, regulated by PADI4 and correlated with lupus serological indicators. IL-8 plays a role in the development of SLE through inflammatory responses, and PADI4/IL-8 provides new thinking for SLE monitoring and therapy.

Key words systemic lupus erythematosus; interleukin 8; peptidylarginine deiminase 4; inflammation; neutrophils; cytokine

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050787)

Corresponding author Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com