

网络出版时间:2024-12-05 14:36:25 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.021

CMPK2 通过 NLRP3 促进 系统性红斑狼疮患者 CD4⁺ T 细胞焦亡

谭亚楠^{1,2}, 蒋格格^{1,2}, 金莉², 项楠², 孙晓歌², 贾晓益¹, 张敏²[¹ 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;² 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院), 合肥 230001]

摘要 目的 探讨胞苷/尿苷单磷酸激酶 2 (CMPK2) 在系统性红斑狼疮 (SLE) 患者 CD4⁺ T 细胞中的表达水平及其与临床指标的相关性, 及其能否通过 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 促进 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞焦亡, 从而为 SLE 的治疗提供新的靶点。方法 RT-qPCR 及 Western blot 检测 CMPK2 在 SLE 患者和健康对照组 (HC) CD4⁺ T 细胞中的 mRNA 及蛋白表达水平; Pearson 或 Spearman 相关性分析评估 CMPK2 mRNA 水平与临床指标的相关性; 检测 SLE 患者及 HC 组 CD4⁺ T 细胞中焦亡相关指标 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、半胱天冬蛋白酶-1 (caspase-1)、消皮素-D (GSDMD)、GSDMD 蛋白氨基端片段 (GSDMD-N) 的表达水平, 并在 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞中沉默 CMPK2 后进一步检测 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 的蛋白表达水平。结果 CMPK2 在 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞中高表达, 与 SLE 疾病活动指数 (SLEDAI)、抗 dsDNA 抗体、抗核小体抗体、抗 C1q 抗体呈正相关, 与补体 C3、C4 呈负相关; SLE 患者 CD4⁺ T 细胞中焦亡相关蛋白 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 表达水平增加 ($P < 0.05$); 此外, 细胞培养上清液中细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平也有所增加, 细胞焦亡率也明显升高 ($P < 0.05$); 沉默 CMPK2 后可减少上述指标的水平 ($P < 0.05$)。结论 CMPK2 在 SLE 患者的 CD4⁺ T 细胞高表达, 并与临床指标有一定相关性, 其可能通过 NLRP3 促进 CD4⁺ T 细胞焦亡参与 SLE 的发展。

关键词 系统性红斑狼疮; CD4⁺ T 细胞; CMPK2; 生物标志物; NLRP3; 焦亡

中图分类号 R 593.24+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2215-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.021

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种目前尚无法根治的慢性自身免疫性疾病, 临床特征表现为自身抗体异常、免疫复合物沉积和组织炎症^[1]。SLE 的发病机制复杂, 目前尚未完全明晰。越来越多的证据表明, 细胞焦亡在 SLE 发病机制中发挥着重要作用^[2], 但是关于细胞焦亡在 SLE 中的发生机制尚未阐明。胞苷/尿苷单磷酸激酶 2 (cytidine/uridine monophosphate kinase 2, CMPK2) 是一种核苷单磷酸激酶, 在线粒体中负责将 (d) CMP/UMP 转化成 (d) CDP/UDP。已有研究^[3]报道其可以通过调控线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的合成, 影响氧化线粒体 DNA (oxidized-mtDNA, ox-mtDNA) 水平, 从而促进 NOD 样

受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎性小体的激活。而 NLRP3 参与了细胞的焦亡途径^[4], 然而 CMPK2 能否通过 NLRP3 促进 CD4⁺ T 细胞焦亡, 进而影响 SLE 的发生发展尚不清楚。该研究探讨了 CMPK2 在 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞中的表达水平, 分析其与临床指标的相关性, 并进一步探索了 CMPK2 对 CD4⁺ T 细胞焦亡的作用机制, 为 SLE 的诊断和治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 病例资料 该研究所涉及的患者样本均是从中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)风湿免疫科获得, 收集时间为 2023 年 8 月至 2024 年 6 月, 共 49 例 SLE 患者外周血样本, 其中女性 46 例, 男性 3 例, 年龄 15~87 (44.22 \pm 16.64) 岁。所有患者均符合美国风湿病学会 (ACR) 修订的 SLE 诊断标准, 患者相关信息详见附表 1。采用 SLE 疾病活动指数 (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 评估疾病活动程度, 并收集患者年龄、性别、抗双链 DNA (dsDNA) 抗体、补体 C3

2024-11-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82074090); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1808085MH298)

作者简介: 谭亚楠, 女, 硕士研究生;

贾晓益, 女, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: jiaxy@ahcm.edu.cn;

张敏, 女, 副主任医师, 通信作者, E-mail: doczhangmin@ustc.edu.cn

和 C4 等实验室指标。实验所用健康样本收集自健康体检中心,共 33 例,其中女性 30 例,男性 3 例,年龄 21 ~ 64 (43.09 ± 12.65) 岁。本研究已经过安徽省立医院伦理委员会同意(伦理批号:2023KY 伦审第 283 号),所有受试者均自愿参加本研究并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 人外周血淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,货号:LTS1077);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,货号:22400089);人 CD4⁺ T 细胞分选试剂盒(德国美天旎生物技术有限公司,货号:130-094-131);CMPK2 抗体、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)抗体、消皮素-D(gasdermin D, GSDMD)抗体(武汉三鹰技术有限公司,货号:25877-1-AP、10500-1-AP、20770-1-AP);半胱天冬蛋白酶-1(cysteine-aspartate-specific proteinase-1, caspase-1)抗体(成都正能生物技术有限公司,货号:342947);NLRP3 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab263899);GSDMD 蛋白氨基端片段(N-terminal domain of GSDMD, GSDMD-N)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF4012);总 RNA 抽提试剂盒(广州美基生物科技有限公司,货号:R4111-02);BioRT Master HiSensi cDNA 第一链合成试剂盒(杭州博日科技股份有限公司,货号:BSB40M1);2 × SYBR Green qPCR Mix(山东思科捷生物技术有限公司,货号:AH0101-B);RiboFECT-CP 转染试剂、riboFECTTM CP 缓冲液(广州锐博生物技术有限公司,货号:U1101、C10511-05);人 IL-18 和 IL-1β ELISA 检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0139H2、MM-0181H2);超敏 ECL 化学发光试剂盒,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0018S、P0012);PI 溶液(Invitrogen,货号:P3566);Caspase-1 p20 Antibody/FITC(英国 EterLife 有限公司,货号:EL900443);CO₂ 培养箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:371);无菌超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-2F);医用离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司,型号:H1750R);化学发光图像分析系统(上海天能生命科学有限公司,型号:Tanon 5200);实时荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦科技有限公司,型号:Mx3000P);多功能酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司,型号:AMR-100T);流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司,型号:CytoFLEX)。

1.3 方法

1.3.1 CD4⁺ T 细胞的提取分离 清晨采集患者及健康对照组(healthy control, HC)外周静脉血于 EDTA 抗凝管中,将血液用等体积 PBS 稀释,之后将血液铺至含淋巴细胞分离液的 15 ml 离心管中,1 500 r/min 离心 21 min,吸取中间白膜层至离心管,2 000 r/min 离心 10 min,向细胞沉淀中加入 80 μl Buffer,重悬细胞,随后加入 20 μl MACS CD4 微珠,避光孵育 15 min,之后过 LS 分选柱,即可得 CD4⁺ T 细胞。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 使用 RNA 抽提试剂盒从细胞中提取总 RNA,随后制备 cDNA,之后检测 CMPK2 的基因表达水平,GAPDH 作为内参。数据采用 2^{-ΔΔC_T} 法分析。人 CMPK2 和 GAPDH 的引物均来自北京擎科生物技术有限公司,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

Gene name	Primer sequence
CMPK2	Forward: 5'-GTACCTCCTTTATTCCTGAAGCC-3'
	Reverse: 3'-ATGGCAACAACCTGGAACCTTT-5'
hGAPDH	Forward: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	Reverse: 3'-ACCACCGCTGTGCTGTAGCCAA-5'

1.3.3 Western blot 收集细胞,使用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,于 -20 ℃ 冰箱反复冻融 3 次,之后 4 ℃、14 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,随后加入蛋白上样缓冲液,100 ℃ 金属浴 10 min^[5]。将样品加载至 10% 凝胶,电泳分离蛋白后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,随后用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h,然后在 4 ℃ 下与相应抗体孵育过夜(GAPDH,1 : 5 000;CMPK2,1 : 2 000;NLRP3,1 : 1 000;ASC,1 : 1 000;caspase-1,1 : 1 000;GSDMD,1 : 5 000;GSDMD-N,1 : 2 000),次日,用 TBST 缓冲液洗涤条带,随后将膜与山羊抗兔抗体(1 : 10 000)在室温下孵育 2 h。使用 ECL 化学发光检测试剂盒对条带进行成像,运用 ImageJ 软件分析条带的灰度值,以目的蛋白相对于内参 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.3.4 ELISA 实验 将前处理结束的细胞收集至 1.5 ml EP 管中,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液用于细胞因子的检测,随后按照试剂盒说明书检测细胞因子水平,使用酶标仪(波长 450 nm)读取吸光度值,根据标准品的浓度和吸光度值制成标准曲线并根据标准曲线得出的公式计算各样本的浓度值。

1.3.5 流式细胞术检测细胞焦亡率 将 caspase-1

用 50 μl DMSO 溶解,之后加入 200 μl PBS 稀释 caspase-1,以 1:50 的比例将稀释后的 caspase-1 加入到细胞悬液中,孵育 1 h,之后 1 500 r/min 离心 10 min 去除液体,加入 PBS 缓冲液重悬细胞,洗涤细胞 3 次,随后加入终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪上机检测, caspase-1 和 PI 双阳性细胞即焦亡细胞。

1.3.6 CMPK2 沉默实验 将 CD4^+ T 细胞接种于 6 孔板,按照 riboFECTTM CP 转染试剂说明书进行转染实验。在干净无酶 EP 管中加入 120 μl 1 \times 的 riboFECTTM CP 缓冲液,再吸取 5 μl 20 $\mu\text{mol/L}$ siRNA 储存液,使储存液浓度为 50 nmol/L,随后加入 12 μl riboFECTTM CP Reagent 至上述 EP 管中,轻轻吹打混匀,室温静置 15 min 后,以 137 μl 每孔加入 6 孔板,转染 48 h 后收集细胞用于后续实验。si-CMPK2 购自广州市锐博生物科技有限公司,沉默靶序列(5'-3')为:GGCTGTCCTCTTAAAGTCA。

1.4 统计学处理 所做实验均重复 3 次,使用统计软件 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计和数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的两组之间的比较采用 t 检验,不符合的采用非参数秩和检验。对于相关性分析,首先使用 Shapiro-Wilk test 法检验数据是否符合正态分布,符合正态分布采用 Pearson 相关性分析,不符合正态分布采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMPK2 在 SLE 患者的 CD4^+ T 细胞中的表达水平 通过 RT-qPCR 实验评估 CMPK2 在 SLE 患者及 HC 组 CD4^+ T 细胞的 mRNA 表达水平,结果显示 SLE 患者 CMPK2 mRNA 水平明显高于 HC 组

($U = 134.000, P < 0.01$),见图 1A。Western blot 实验结果表明 SLE 患者 CD4^+ T 细胞中 CMPK2 的蛋白水平相较于 HC 组增加($t = 4.318, P < 0.05$),见图 1B。

2.2 CMPK2 与临床指标的相关性的分析 分析 SLE 患者 CD4^+ T 细胞中 CMPK2 的 mRNA 表达水平与临床指标的相关性,结果显示 CMPK2 表达水平与 SLEDAI($r = 0.447, P < 0.05$)呈正相关(图 2A),与补体 C3($r = -0.560, P < 0.001$)和补体 C4($r = -0.456, P < 0.01$)呈负相关(图 2B、2C),与抗 dsDNA 抗体($r = 0.404, P < 0.05$)、抗核小体抗体($r = 0.423, P < 0.05$)和抗 C1q 抗体($r = 0.447, P < 0.05$)也呈正相关(图 2D、2F)。

2.3 SLE 患者 CD4^+ T 细胞的焦亡水平 通过实验发现 SLE 患者 CD4^+ T 细胞中 NLRP3($t = 5.728, P < 0.01$)、ASC($t = 4.027, P < 0.05$)、caspase-1($t = 5.947, P < 0.01$)、GSDMD($t = 6.983, P < 0.01$)、GSDMD-N($t = 3.087, P < 0.05$)蛋白水平均高于 HC 组(图 3A)。此外,SLE 组细胞培养上清中 IL-1 β ($t = 9.011, P < 0.05$)及 IL-18($t = 2.594, P < 0.01$)水平也增加(图 3B、3C)。随后的流式细胞术实验也发现 SLE 患者 CD4^+ T 细胞焦亡率明显高于 HC 组($t = 91.790, P < 0.01$)(图 3D)。

2.4 沉默 CMPK2 对 CD4^+ T 细胞焦亡的影响 为探究 CMPK2 是否影响 CD4^+ T 细胞焦亡,在 SLE 患者 CD4^+ T 细胞中沉默 CMPK2,Western blot 实验检测沉默效率,同时检测细胞焦亡相关蛋白、细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 细胞因子水平,以及细胞的焦亡率。实验结果显示,si-CMPK2 组 CMPK2 蛋白水平低于 si-NC 组($t = 3.593, P < 0.01$),见图 4A,这一结果证实 CMPK2 沉默成功,可以进行后续实验。

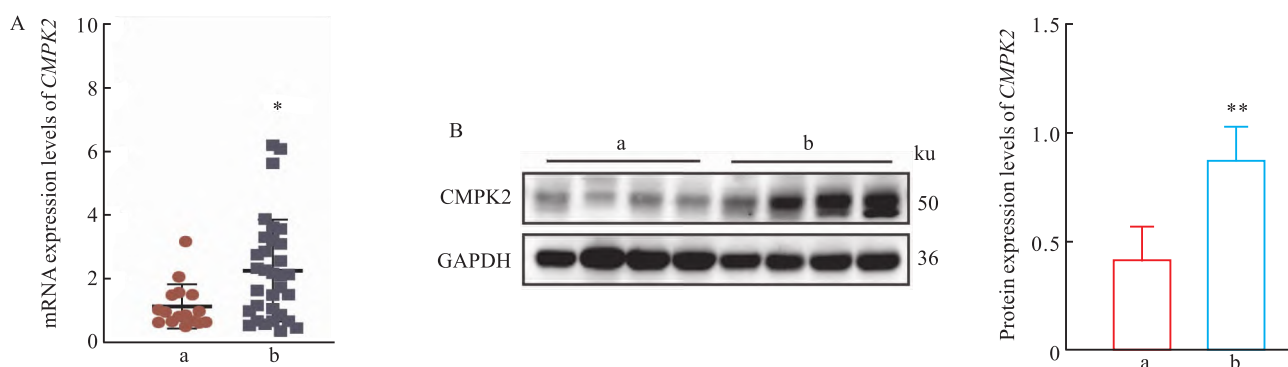


图 1 CMPK2 在 HC 和 SLE 患者 CD4^+ T 细胞中的表达水平分析

Fig. 1 Analysis of CMPK2 expression levels in CD4^+ T cells from both HC and SLE patients

A: CMPK2 mRNA expression levels detected by RT-qPCR (a: $n = 16$, b: $n = 32$); B: Western blot showed CMPK2 protein expression levels; a: HC group($n = 8$); b: SLE group($n = 8$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HC group.

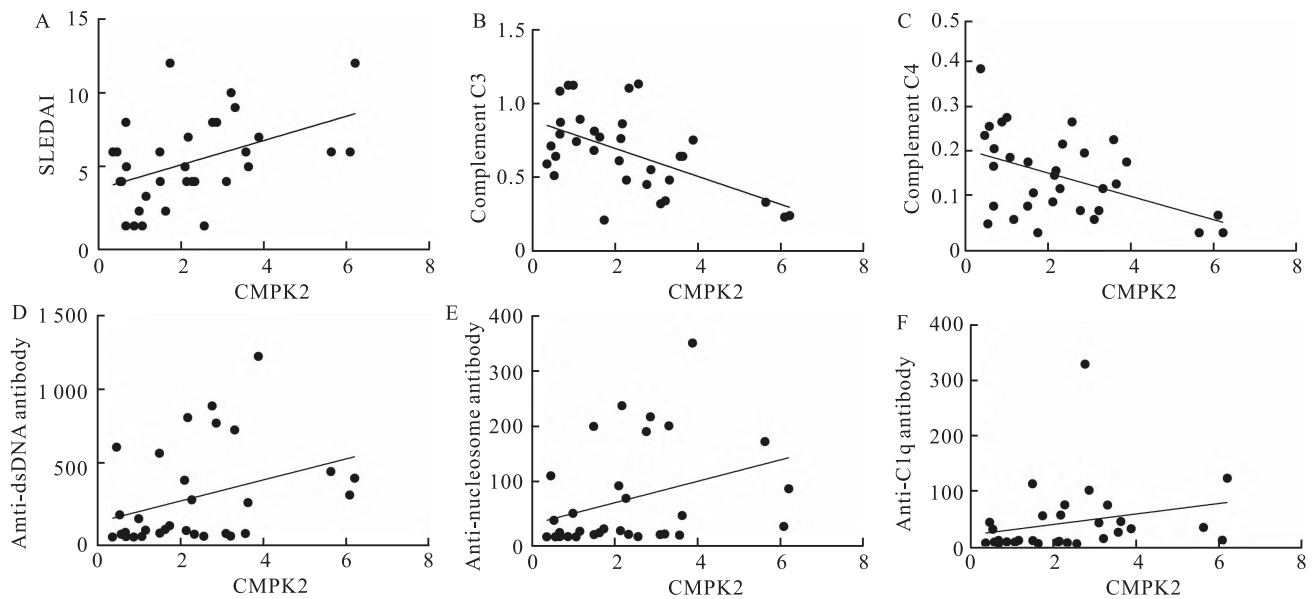
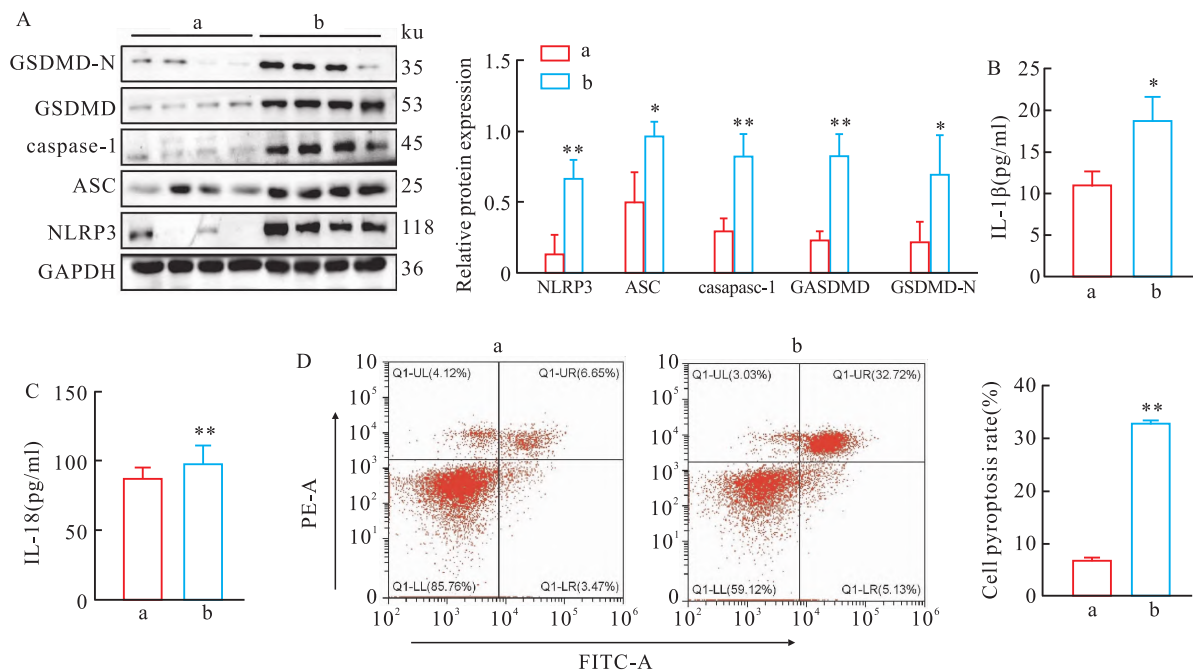


图2 CMPK2 与临床指标的相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of CMPK2 with clinical indicators

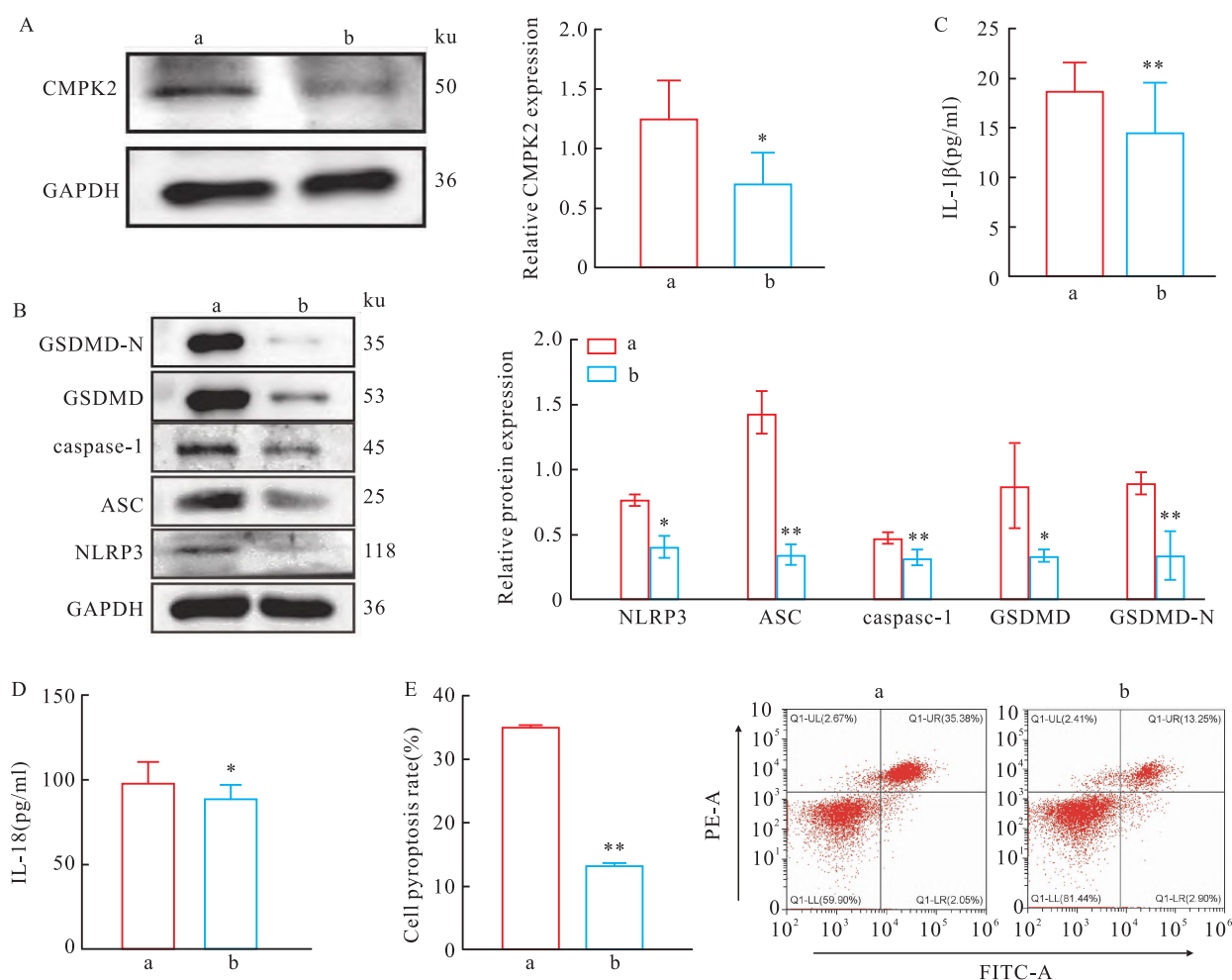
A - E: Correlation of CMPK2 mRNA levels with SLEDAI, complement C3, complement C4, anti-dsDNA antibody, anti-nucleosome antibody and anti-C1q antibody.

图3 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞的焦亡水平Fig. 3 Levels of CD4⁺ T cell pyroptosis in SLE patients

A: NLRP3, ASC, caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N protein expression levels detected by Western blot; B: Levels of cytokine IL-1 β in cell culture supernatants detected by ELISA; C: Levels of inflammatory cytokine IL-18 in cell culture supernatants detected by ELISA; D: Cell pyroptosis rate detected by flow cytometry; compared with HC group; a: HC group; b: SLE group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HC group.

实验结果显示沉默 *CMPK2* 后可以降低焦亡相关蛋白 NLRP3 ($t = 3.577$, $P < 0.05$)、ASC ($t = 6.514$, $P < 0.01$)、caspase-1 ($t = 10.340$, $P < 0.01$)、GSDMD ($t = 2.816$, $P < 0.05$)、GSDMD-N ($t = 6.605$, $P < 0.01$)

蛋白水平(图4B),以及细胞因子 IL-1 β ($t = 2.962$, $P < 0.01$) 及 IL-18 ($t = 2.240$, $P < 0.05$) 水平(图4C、4D);此外, CD4⁺ T 细胞焦亡率也降低 ($t = 92.160$, $P < 0.01$),见图4E。

图4 沉默CMPK2对CD4⁺T细胞焦亡的影响Fig. 4 Effect of silencing CMPK2 on CD4⁺T cell Pyroptosis

A: CMPK2 transfection efficiency detected by Western blot; B: NLRP3, ASC, caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N protein expression levels detected by Western blot; C, D: Levels of cytokine IL-1β and IL-18 in cell culture supernatants detected by ELISA; E: Cell pyroptosis rate detected by flow cytometry; a: si-NC group; b: si-CMPK2 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

3 讨论

SLE是一种复杂的自身免疫性疾病,其特征是全身免疫耐受丧失并伴有广泛的炎症^[6]。作为炎症反应的核心者,T细胞具有多种功能,它们可以分化成CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,前者负责调节先天性免疫细胞和其他适应性免疫细胞,后者则直接杀死病原体或异常细胞^[7]。传统观念认为SLE是由B细胞介导的疾病,但实际上,B淋巴细胞的活化是依赖于T细胞的,研究^[8]表明,缺乏CD4⁺T细胞的参与,单独的B细胞无法引发SLE相关炎症反应,这些发现提示调控CD4⁺T细胞对于缓解SLE疾病进展的重要性。

通过分析课题组RNA-seq数据发现CMPK2在

SLE患者的外周血单个核细胞中高表达,并且已有文献^[9]报道SLE患者CD4⁺T细胞中CMPK2 mRNA表达水平明显高于HC组,但是研究仅停留在基因层面的验证,未进行蛋白水平的检测。该项研究则进一步证明了CMPK2在SLE患者CD4⁺T细胞中表达水平增加。目前SLE疾病活动度的评估主要依赖两种方法,即SLE疾病活动指数(SLEDAI-2000)和英国岛狼疮评估指数(BILAG-2004)^[10-11]。这两种方法均需结合疾病相关的临床表现和实验室检查结果来进行评估,进行起来较为复杂,应用起来有一定局限性。因此,寻找更简便、安全的实验室指标评估SLE疾病活动度具有重要意义。从理论上讲,血清分子易受环境影响,而CD4⁺T细胞中的分子表达受影响较小,在评估SLE严重程度方面具有

更大的优势^[12]。SLEDAI 是评估临床疾病活动度的常用的指标,代表 SLE 疾病的活动程度。此外,研究^[13-14]报道抗 dsDNA 抗体、抗核小体抗体、抗 C1q 抗体,以及补体 C3、C4 降低均与疾病活动有关。本研究结果显示 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞 CMPK2 mRNA 水平与临床指标 SLEDAI、抗 dsDNA 抗体、抗核小体抗体和抗 C1q 抗体呈正相关,与补体 C3、C4 呈负相关。这些发现提示 CMPK2 可能在 SLE 的发病中发挥作用,并对评估 SLE 疾病活动度具有一定的价值。

焦亡是一种新的细胞程序性死亡方式,伴随着质膜渗透、细胞肿胀和溶解^[15]。细胞焦亡机制包括经典途径和非经典途径。在经典的焦亡途径中,caspase-1 首先被 NLRP3 炎性小体激活,之后裂解 GSDMD 形成 GSDMD-N,后者具有成孔活性并诱导焦亡,同时释放成熟的 IL-1 β 和 IL-18,然后,IL-1 β 和 IL-18 启动免疫反应,从而放大炎症反应并启动焦亡,这种焦亡途径介导的炎症环境可能破坏 SLE 患者免疫耐受性,进而诱导 SLE 的发生和发展^[16]。研究^[17]表明 CMPK2 在 NLRP3 炎性小体的激活中扮演着重要角色,而 NLRP3 介导细胞焦亡途径^[18],因此推测 CMPK2 可能通过 NLRP3 介导 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞焦亡。本研究检测 HC 和 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞焦亡相关蛋白水平、炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18 水平以及细胞的焦亡率。实验结果显示 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD 及 GSDMD-N 的表达水平明显增加,同时 IL-18、IL-1 β 水平也升高,并且细胞的焦亡率也明显增加,表明 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞存在焦亡现象,这一结果与 Zhang et al^[19] 的研究相符。在沉默 CMPK2 后,上述指标的水平显著降低,提示沉默 CMPK2 有助于减轻 CD4⁺ T 细胞的焦亡,这一结果可能也解释了 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞减少的机制。

综上所述,CMPK2 在 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞中高表达,并与 SLEDAI 和低补体等临床指标密切相关。此外,SLE 患者 CD4⁺ T 细胞焦亡水平增加,CMPK2 可能通过 NLRP3 促进 CD4⁺ T 细胞焦亡,然而具体机制仍需进一步探索,该研究有望为 SLE 疾病活动度的评估提供新依据,并且为 SLE 的治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] Honarpisheh M, Köhler P, von Rauchhaupt E, et al. The involvement of microRNAs in modulation of innate and adaptive immunity in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 4126106. doi:10.1155/2018/4126106.
- [2] Zhang Y, Niu L, Wang F, et al. Vitamin D receptor expression in SLE peripheral blood CD4⁺ T cells is associated with disease activity and cell apoptosis[J]. Mod Rheumatol, 2022, 32(3): 577-83. doi:10.1093/mr/roab023.
- [3] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2018, 560(7717): 198-203. doi:10.1038/s41586-018-0372-z.
- [4] Liu Y, Zhang Y, Liu Q, et al. Inhibition of DDX3X ameliorated CD4⁺ T cells pyroptosis and improves survival in septic mice[J]. Mol Immunol, 2023, 154: 54-60. doi:10.1016/j.molimm.2022.12.014.
- [5] 胡爽,陈晓冉,冯钰斌. DDX5 对白血病 K562 细胞生物学功能的影响及其机制[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(9): 1557-63. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.010.
- [5] Hu S, Chen X R, Feng Y B. Effect of DDX5 on the biological function of leukemia K562 cells and its mechanism[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(9): 1557-63. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.010.
- [6] Li H, Boulougoura A, Endo Y, et al. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies[J]. J Autoimmun, 2022, 132: 102870. doi:10.1016/j.jaut.2022.102870.
- [7] Gaudino S J, Kumar P. Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis[J]. Front Immunol, 2019, 10: 360. doi:10.3389/fimmu.2019.00360.
- [8] Dolf S, Scharpenberg C, Specker C, et al. IL-22 production of effector CD4⁺ T-cells is altered in SLE patients[J]. Eur J Med Res, 2019, 24(1): 24. doi:10.1186/s40001-019-0385-6.
- [9] Lai J H, Hung L F, Huang C Y, et al. Mitochondrial protein CMPK2 regulates IFN alpha-enhanced foam cell formation, potentially contributing to premature atherosclerosis in SLE[J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 120. doi:10.1186/s13075-021-02470-6.
- [10] Yee C S, Isenberg D A, Prabu A, et al. BILAG-2004 index captures systemic lupus erythematosus disease activity better than SLEDAI-2000[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(6): 873-6. doi:10.1136/ard.2007.070847.
- [11] Inês L S, Fredi M, Jesus D, et al. What is the best instrument to measure disease activity in SLE? - SLE-DAS vs Easy BILAG[J]. Autoimmun Rev, 2024, 23(1): 103428. doi:10.1016/j.autrev.2023.103428.
- [12] Gong A, Mi L, Wei F, et al. Downregulation of miR-137 facilitates CD4⁺ T cell pyroptosis in systemic lupus erythematosus via stimulating AMPK pathway[J]. J Immunol Res, 2023, 2023: 1241774. doi:10.1155/2023/1241774.
- [13] Shang X, Ren L, Sun G, et al. Anti-dsDNA, anti-nucleosome,

- anti-C1q, and anti-histone antibodies as markers of active lupus nephritis and systemic lupus erythematosus disease activity[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(2): 407–18. doi:10.1002/iid3.401.
- [14] Li H, Lin S, Yang S, et al. Diagnostic value of serum complement C3 and C4 levels in Chinese patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(3): 471–7. doi:10.1007/s10067-014-2843-4.
- [15] Li S, Sun Y, Song M, et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression[J]. JCI Insight, 2021, 6(23): e146852. doi:10.1172/jci.insight.146852.
- [16] Guo R, Wang H, Cui N. Autophagy regulation on pyroptosis; mechanism and medical implication in sepsis[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 9925059. doi:10.1155/2021/9925059.
- [17] Luo Y, Zheng D, Mou T, et al. CMPK2 accelerates liver ischemia/reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(6): 1358. doi:10.3892/etm.2021.10793.
- [18] Li Y, Song W, Tong Y, et al. Isoliquiritin ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via miRNA-27a/SYK/NF- κ B axis[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 1. doi:10.1186/s12974-020-02040-8.
- [19] Zhang C, Zhang C, Huang C, et al. Hsa_circ_0012919 promotes pyroptosis in CD4⁺ T cells of systemic lupus erythematosus by miR-125a-3p/GSDMD axis[J]. Exp Dermatol, 2023, 32(1): 41–9. doi:10.1111/exd.14680.

CMPK2 promotes CD4⁺ T cell pyroptosis via NLRP3 in systemic lupus erythematosus

Tan Yanan^{1,2}, Jiang Gege^{1,2}, Jin Li², Xiang Nan², Sun Xiaoge², Jia Xiaoyi¹, Zhang Min²

¹School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012;

²The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001]

Abstract Objective To investigate the levels of cytidine/uridine monophosphate kinase 2 (CMPK2) expression in CD4⁺ T cells of systemic lupus erythematosus (SLE) patients and its correlation with clinical indicators. Additionally, to explore whether CMPK2 can induce pyroptosis in CD4⁺ T cells of SLE patients through NLRP3, potentially providing a new target for the diagnosis and treatment of SLE. **Methods** RT-qPCR and Western blot analyses were used to assess the gene and protein expression levels of CMPK2 in SLE CD4⁺ T cells and healthy controls (HC). Pearson or Spearman correlation analysis was performed to evaluate the relationship between CMPK2 mRNA expression levels and clinical indicators. Subsequently, the expression levels of pyroptosis-related proteins, including NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), caspase-1, gasdermin D (GSDMD), and the N-terminal domain of GSDMD (GSDMD-N), were examined in SLE CD4⁺ T cells and HC. Furthermore, the protein expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N were detected after silencing *CMPK2* in SLE CD4⁺ T cells. **Results** CMPK2 expression was significantly elevated in SLE CD4⁺ T cells, exhibiting a positive correlation with SLE disease activity index (SLEDAI), anti-dsDNA antibody, anti-nucleosome antibody, anti-C1q antibody, and a negative correlation with complement C3 and C4 levels. Additionally, the expression levels of pyroptosis-related proteins, including NLRP3, ASC, caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N significantly increased in SLE CD4⁺ T cells ($P < 0.05$). Moreover, the levels of cytokines IL-1 β and IL-18 in the cell culture supernatants were elevated, and there was a notable increase in the rate of cellular pyroptosis ($P < 0.05$). Silencing CMPK2 led to a reduction in the levels of these markers ($P < 0.05$). **Conclusion** CMPK2 is highly expressed in SLE CD4⁺ T cells and may serve as a diagnostic marker for SLE. Moreover, it is likely involved in the pathogenesis of SLE by promoting CD4⁺ T cell pyroptosis through NLRP3.

Key words systemic lupus erythematosus; CD4⁺ T cell; CMPK2; biomarker; NLRP3; pyroptosis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82074090); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1808085MH298)

Corresponding Authors Jia Xiaoyi, E-mail: jiaxy@ahcm.edu.cn; Zhang Min, E-mail: doczhangmin@ustc.edu.cn