

易呈志,李鸣,吴威,等. 基于 NLRP12 调控巨噬细胞泛凋亡探讨游离血红素对脓毒症免疫抑制模型小鼠的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(6): 69–81.

Yi CZ, Li M, Wu W, et al. Effect of free Heme on sepsis-induced immunosuppression model mice based on regulation of macrophage PANoptosis by NLRP12 [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(6): 69–81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2026.06.007

基于 NLRP12 调控巨噬细胞泛凋亡探讨 游离血红素对脓毒症免疫抑制模型小鼠的影响

易呈志¹, 李 鸣^{1*}, 吴 威², 刘 鹏¹

(1.武汉市第四医院 古田院区 急诊外科,武汉 430030;2.武汉市第四医院 古田院区 急诊内科,武汉 430030)

【摘要】 目的 基于含 NLR 家族 pyrin 结构域 12 (NLRP12) 调控巨噬细胞泛凋亡探讨游离血红素 (Heme) 对脓毒症免疫抑制模型小鼠的影响。**方法** 构建脓毒症模型小鼠并将其分为模型 (Model) 组、游离血红素 (Heme) 组、游离血红素+阴性对照质粒转染 (Heme+si-NC) 组、游离血红素+NLRP12 低表达质粒转染 (Heme+si-NLRP12) 组, 每组 12 只小鼠。另取 12 只仅暴露盲肠不进行结扎和穿刺的小鼠作为假手术 (Sham) 组。检测各组小鼠血清中炎症因子水平 (ELISA 法)、CD4⁺/CD8⁺ 比值 (流式细胞术法)、肺组织病理变化 (HE 染色法)、细胞凋亡情况 (TUNEL 染色法)、肺组织中泛凋亡相关蛋白表达量 (Western blot 法)。为进一步明确 Heme 调节 NLRP12 的作用机制, 以 LPS 感染小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 诱导脓毒症细胞模型, 并将其分为 LPS 组、LPS+Heme 组、LPS+Heme+si-NC 组、LPS+Heme+si-NLRP12 组, 以正常培养的 BMDM 作为对照 (Control) 组。检测 BMDM 上清炎症因子水平 (ELISA 法)、细胞存活率 (CCK-8 法)、凋亡率 (TUNEL 法) 及泛凋亡相关蛋白表达水平 (Western blot 法)。**结果** 与 Model 组比较, Heme 组可进一步提高脓毒症小鼠血清炎症因子水平、加重肺组织损伤和细胞凋亡、促进细胞的泛凋亡进展, 降低血清 CD4⁺/CD8⁺ 比值 ($P<0.05$); 与 Heme+si-NC 组比较, Heme+si-NLRP12 组脓毒症小鼠肺组织病理损伤及泛凋亡过程减轻、血清炎症因子水平及肺组织细胞凋亡率下降、血清 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高 ($P<0.05$)。细胞实验显示 LPS 组细胞存活率显著下降、细胞泛凋亡过程及上清炎症因子水平明显增加 ($P<0.05$); LPS+Heme 组相较于 LPS 组细胞凋亡率、泛凋亡过程及炎症因子水平进一步增加 ($P<0.05$); 与 LPS+Heme+si-NC 组比较, LPS+Heme+si-NLRP12 组细胞存活率显著增加、凋亡率及上清炎症因子水平降低, NLRP12、Bax、Caspase-8、p-RIPK3 及 GSDMD-N 表达量显著下降 ($P<0.05$)。**结论** Heme 可能通过上调 NLRP12 的表达诱导巨噬细胞泛凋亡, 进而加强脓毒症的免疫抑制作用。

【关键词】 血红素; 脓毒症免疫抑制小鼠; 巨噬细胞泛凋亡; 含 NLR 家族 pyrin 结构域 12

【中图分类号】 R631; R364.5; R392 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2026) 06-0069-13

Effect of free Heme on sepsis-induced immunosuppression model mice based on regulation of macrophage PANoptosis by NLRP12

【基金项目】 武汉市医学科学研究项目 (WX23Z53)。

【作者简介】 易呈志 (1982—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 创伤急危重症, 脓毒症。E-mail: ChengzhiYi1105@163.com

【通信作者】 李鸣 (1970—), 男, 本科, 主任医师, 研究方向: 肝胆、胃肠等疾病的诊治及腹腔镜治疗。E-mail: i0brbr@163.com

YI Chengzhi¹, LI Ming^{1*}, WU Wei², LIU Peng¹

(1. Emergency Surgery, Wuhan Fourth Hospital Gutian Campus, Wuhan 430030, China.

2. Emergency Internal Medicine, Wuhan Fourth Hospital Gutian Campus, Wuhan 430030)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of free Heme on sepsis-induced immunosuppression model mice based on regulation of macrophage PANoptosis by NLR family pyrin domain containing 12 (NLRP12). **Methods** A sepsis mouse model was constructed and the mice were divided into Model, Heme, Heme+empty plasmid (Heme+si-NC), and Heme+NLRP12 low-expression plasmid groups (Heme+si-NLRP12) ($n=12$ mice per group). Another 12 mice with exposed cecum without ligation or puncture were considered as the sham surgery group (Sham). Serum levels of inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The CD4⁺/CD8⁺ ratio in the blood was detected by flow cytometry, pathological changes in lung tissue were detected by hematoxylin/eosin staining, apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) staining, and expression levels of PANoptosis-related proteins in lung tissue were detected by Western blot. To clarify the mechanism by which heme regulates NLRP12, sepsis cell models were induced using lipopolysaccharide (LPS)-infected mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM). Model mice were divided into LPS, LPS+Heme, LPS+Heme+si-NC group, and LPS+Heme+si-NLRP12 groups, with mice administered normally cultivated BMDMs as the Control group. Levels of inflammatory factors in the BMDM supernatant were detected by ELISA, cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 assay, apoptosis rate was detected by TUNEL staining, and expression levels of PANoptosis-related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the Model group, rats in the heme group showed increased serum levels of inflammatory factors, aggravated lung tissue injury and cell apoptosis, and progression of cell PANoptosis, while the CD4⁺/CD8⁺ ratio was reduced ($P<0.05$). Compared with the Heme+si-NC group, pathological lung tissue damage and the process of PANoptosis were alleviated in the Heme+si-NLRP12 group, serum levels of inflammatory factors, and the apoptosis rate of lung tissue cells were decreased, while the CD4⁺/CD8⁺ ratio was increased ($P<0.05$). Cell experiments showed that the cell survival rate was significantly decreased in the LPS group, while the process of cell PANoptosis and levels of inflammatory factors in the supernatant were increased ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the apoptosis rate, process of PANoptosis, and levels of inflammatory factors were further increased in the LPS+Heme group ($P<0.05$). Compared to the LPS+Heme+si-NC group, the LPS+Heme+si-NLRP12 group exhibited significantly increased cell viability, reduced apoptosis and supernatant inflammatory factor levels, along with decreased expression of NLRP12, Bax, Caspase-8, p-RIPK3, and GSDMD-N ($P<0.05$). **Conclusions** Heme may induce macrophage PANoptosis by upregulating NLRP12, thereby enhancing immune suppression in sepsis.

【Keywords】 Heme; sepsis immunosuppressed mice; macrophage PANoptosis; NLR family pyrin domain containing 12

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脓毒症是一种由感染引起的全身炎症反应综合症。在脓毒症的病理进程中,免疫功能紊乱扮演着核心角色,尤其是疾病后期出现的免疫抑制状态,会导致机体对病原体的清除能力下降,进而引发继发感染与多器官功能障碍,严重影响患者的预后^[1,2]。最新的研究表明促炎因子和免疫抑制因子在脓毒症中发挥协同作用,许多脓毒症患者免疫抑制状态下死于继发性感染^[3],因而了解免疫抑制的病理机制对脓毒症的治疗至关重要。损伤相关分子模式 (damage-associated

molecular patterns, DAMPs) 是在细胞损伤或应激中产生的内源性危险分子,会诱导炎症的发生^[4]。在脓毒症期间, DAMPs 对固有免疫系统的全身性激活会导致严重且持续的炎症反应^[5]。血液中游离血红素 (hemoglobin, Heme) 是一种中枢性 DAMPs, 可作为多种疾病 (如感染、炎症和溶血性疾病) 的危险信号^[6]。当红细胞受损或溶解时, Heme 释放到血液中可以激活先天免疫有助于宿主防御病原体, 然而过量的 Heme 会导致组织损伤和器官功能障碍。既往研究显示, Heme

的积累在脓毒症多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的病理生理学中起着至关重要的作用^[7]。鉴于 Heme 在驱动病理中的作用,迫切需要识别 Heme 先天免疫感知通路中的治疗靶点以减轻有害影响。

泛凋亡(programmed cell death with features of pyroptosis, apoptosis and/or necroptosis, PANoptosis)是程序性细胞死亡的一种新形式,其特征是细胞凋亡、焦亡和坏死性凋亡,目前 PANoptosis 已成为各种疾病的前瞻性和有前途的治疗靶点^[8]。Nod 样受体蛋白 12 (Nod-like receptor protein 12, NLRP12)是一类胞内的免疫感受元件家族,通过识别病原和损伤相关分子从而形成炎性小体,响应病原体引起的严重感染^[9]。此外,研究表明 NLRP12-泛凋亡复合体(Pyrin- and ZBP1-mediated apoptosis, necroptosis, and pyroptosis oligomeric signaling complex, PANoptosome)作为 PANoptosis 常见的调控分子,在调节 LPS 诱导的肺微血管内皮细胞损伤中发挥重要作用^[10]。更有研究表明 NLRP12 可识别 Heme 和病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)从而驱动坏死细胞死亡和炎症^[11]。SUNDARAM 等^[12]研究指出,急性肾损伤和溶血性疾病模型中 Heme 可以调控 NLRP12 的表达,驱动炎症小体和 PANoptosome 激活,进而通过半胱氨酸蛋白酶(cysteine aspartate protease, Caspase)-8/受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3)诱导炎症细胞死亡。由于脓毒症患者 Heme 升高,本研究推测 Heme 可能作为 DAMPs 通过诱导 NLRP12 表达上调进而激活 PANoptosome,加重脓毒症的病理损伤。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

65 只 7~8 周龄、体质量 20~22 g 的 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠购自武汉万千佳兴生物科技有限公司[SCXK(鄂)2021-0011],饲养于武汉万千佳兴生物科技有限公司实验动物设施[SYXK(鄂)2021-0079]。所有小鼠单独饲养在适宜环境(温度 26~28 ℃,相对湿度 40%~60%)中,自由饮食

与活动。本实验经武汉万千佳兴生物科技有限公司动物伦理委员会批准(202404087),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM),批号 XB2645,购自优利科(上海)生命科学有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

氯化血红素(CAS: H755736,纯度: ≥96%, Aladdin 公司);HE 染色试剂盒、CCK-8 试剂盒、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒、白细胞介素(interleukin-6, IL)-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(G1120、1210、1020、0007、0034, Solarbio 公司);CD4-PE、CD8-FITC(154009、008182, 上海甄准生物科技有限公司);NLRP12 抗体(30998, 武汉三鹰生物技术有限公司);RIPK3、p-RIPK3、混合系激酶域样(mixed lineage kinase domain-like, MLKL)、p-MLKL、GSDMD-N、Bax、Caspase-1、Caspase-8、Bcl2、 β -actin 抗体(91702、15828、37333、37705、39754、2772、83383、4790、3498、4967, Cell Signaling Technology 公司);si-NC、si-NLRP12 质粒由锐博生物公司构建(通过 BLAST 严格验证 shRNA 序列,所有质粒需无内毒素纯化)。流式细胞仪(Accuri C6, 美国 BD 公司);电泳仪(DYCZ-25D, 北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建模

适应性喂养 7 d 后,参考相关文献^[13]建立脓毒症免疫抑制模型小鼠。具体操作如下:小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,腹部剃毛消毒后沿腹部中线切开;分离出盲肠,在距离盲肠尖端约 1 cm 处,将盲肠分离并结扎。用 23 号针扎两次,从扎针部位挤出少量粪便,然后将盲肠复位、缝合切口。24 h 后观察到小鼠精神状态萎靡、竖毛、活动减少,T 细胞(CD4⁺、CD8⁺)比例下降,说明脓毒症免疫抑制模型构建成功。造模期间 5 只小鼠死亡,及时补充新的小鼠进行造模,造模成功的 48 只小鼠用于后续实验。另取(12 只)仅暴露盲肠不进行结扎和穿刺的小鼠作为假手术(Sham)组。

1.3.2 分组

将造模成功的小鼠随机分为模型(Model)

组、游离血红素(Heme)组、游离血红素+阴性对照质粒转染(Heme+si-NC)组、游离血红素+NLRP12低表达质粒转染(Heme+si-NLRP12)组,每组12只小鼠。其中Heme组小鼠腹腔注射30 mg/kg的Heme^[14];Heme+si-NC组小鼠腹腔注射30 mg/kg的Heme、尾静脉注射si-NC;Heme+si-NLRP12组小鼠腹腔注射30 mg/kg的Heme、尾静脉注射si-NLRP12。以上给药方式均为每天1次,持续14 d。Control组和Model组各取12只小鼠尾静脉注射等量的0.9%氯化钠溶液。

1.3.3 指标检测及方法

(1) 血清炎症因子和CD4⁺/CD8⁺水平检测

实验结束后,对每组小鼠进行腹主动脉采血,离心取上清。根据试剂盒上的说明加样、洗涤;加检测抗体、洗涤;加酶结合物、洗涤;显色、终止反应后将ELISA板放入酶标仪中检测各孔吸光度,绘制标准曲线计算IL-6、TNF- α 水平。

取一定体积的抗凝血加入流式专用试管中,加入红细胞裂解液,室温下避光孵育10 min后,离心弃上清,向细胞沉淀中加入PBS缓冲液,离心弃上清,重复洗涤后制成单细胞悬液。分别加入CD4-PE(橙红色荧光)、CD8-FITC(绿色荧光)单克隆抗体,室温下避光孵育30 min。随后加入红细胞裂解液,室温下避光孵育10 min后,离心弃上清,保留细胞沉淀。向细胞沉淀中加入PBS缓冲液,离心弃上清,重复洗涤后制成单细胞悬液。通过流式细胞仪分析检测CD4⁺、CD8⁺百分比及CD4⁺/CD8⁺比值。

(2) 肺组织HE染色

各组随机取6只小鼠安乐死后取肺组织经4%多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(5 μ m)、脱蜡复水后依次进行苏木素染色和伊红染色,后经脱水透明、封片等处理后,于显微镜下进行拍照观察。根据肺泡充血、出血、中性粒细胞浸润情况,进行评分:0分,无损伤;1分,轻度损伤;2分,中度损伤;3分,重度损伤;4分,极重损伤。总分越高,损伤越严重。

(3) 肺组织TUNEL染色

取“1.3.3(2)”项肺组织切片进行常规脱蜡去水、0.1% Triton X-100通透处理、灭活内源性过氧化物酶后加入TUNEL反应液避光孵育,PBS冲洗后滴加DAPI染液避光孵育,PBS冲洗后滴加

抗荧光淬灭封片剂,于显微镜下观察并拍摄每只小鼠5张染色图片。其中,凋亡细胞核染色为绿色荧光,肺组织细胞核为蓝色荧光。细胞凋亡占比/%=绿色荧光/蓝色荧光 $\times$ 100%。

(4) Western blot 检测肺组织PANoptosis 相关蛋白表达

各组剩余6只小鼠安乐死后,取新鲜肺组织加入蛋白裂解液充分匀浆,离心取上清,提取并定量总蛋白(BCA法)。蛋白经变性处理后进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后将其转移到PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭2 h后分别与NLRP12、p-RIPK3、GSDMD-N、Bax、Caspase-8、Bcl2、 β -actin一抗孵育过夜。次日膜经TBST洗涤后,室温下与二抗孵育2 h,可视化处理后用ImageJ 1.8.1软件进行量化分析。

(5) BMDM 培养及分组

将冻存的小鼠BMDM细胞复苏后置于DMEM培养基中,在标准环境的细胞培养箱中进行培养,待细胞融合度达90%左右时进行传代。将传代3次的细胞分为对照组(Control组)、LPS组(1 mg/L LPS处理)、LPS+Heme组(1 mg/L LPS+含200 μ mol/L Heme培养基处理)^[15]、LPS+Heme+si-NC组(1 mg/L LPS+含200 μ mol/L Heme培养基+脂质体2000转染si-NC处理)、LPS+Heme+si-NLRP12组(1 mg/L LPS+含200 μ mol/L Heme培养基+脂质体2000转染si-NLRP12处理)。继续培养48 h后检测相关指标。

(6) BMDM 活性检测

收集各组细胞以 1×10^5 /孔接种在96孔板中,在标准环境的细胞培养箱中培养24 h后,分别向每孔中加入10 μ L CCK-8试剂,孵育2 h后用酶标仪测定波长在450 nm处的吸光度并进行计算。

(7) BMDM 培养上清液炎症因子水平检测

收集各组细胞上清液,按照ELISA试剂盒的说明检测IL-6和TNF- α 的水平。

(8) BMDM 凋亡率检测

收集各组细胞经PBS清洗后离心弃上清;沉淀加入结合缓冲液并调整细胞浓度,制成细胞悬液;按试剂盒的说明分别加入AnnexinV-FITC和PI(各5 μ L),暗环境下反应10 min后加入结合缓冲液立即用流式细胞仪进行检测。

(9) BMDM 中 PANoptosis 相关蛋白表达量检测

收集各组细胞,检测方法同“1.3.3(4)”。

1.4 统计学方法

所有数据处理与分析均使用 SPSS24.0 程序进行。计量资料符合正态分布以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 SNK- q 检验进行。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清炎症因子水平比较

与 Sham 组比较,Model 组小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平明显升高($P<0.05$);与 Model 组比较,Heme 组小鼠血清中炎症因子水平进一步升高($P<0.05$);与 Heme+si-NC 组相比,Heme+si-NLRP12 组炎症因子水平明显下降($P<0.05$)。见图 1。

2.2 各组小鼠血清 CD4⁺/CD8⁺ 比较

与 Sham 组比较,Model 组小鼠血清 CD8⁺ 比例升高,CD4⁺ 比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低($P<0.05$);与 Model 组比较,Heme 组小鼠血清 CD8⁺ 比例升高,CD4⁺ 比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值进一步下降($P<0.05$);与 Heme+si-NC 组相比,Heme+si-NLRP12 组 CD8⁺ 比例下降,CD4⁺ 比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高($P<0.05$)。见图 2、图 3。

2.3 各组小鼠肺组织病理变化

如图 4、图 5 所示,Sham 组小鼠肺组织染色清

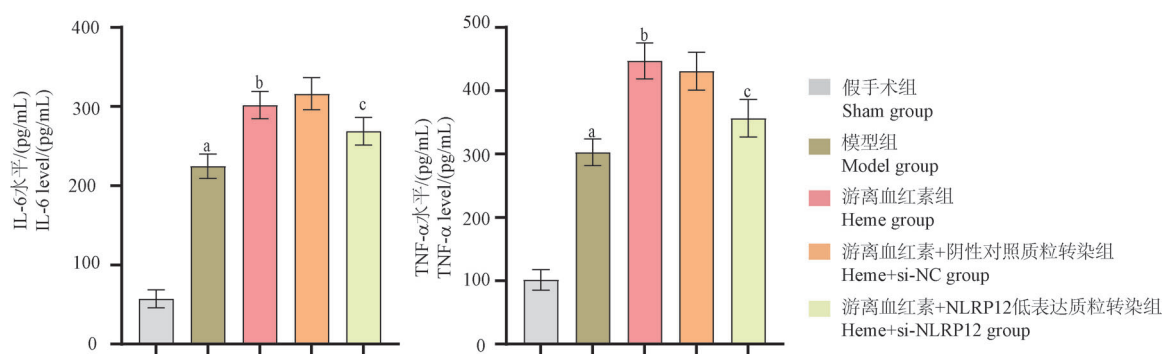
晰且均匀,结构完整;相较于 Sham 组,Model 组小鼠肺泡腔变窄并伴有炎性细胞浸润、肺间质水肿,肺损伤评分增大($P<0.05$);相较于 Model 组,Heme 组小鼠肺组织病理损伤更加严重、大量炎性细胞浸润,肺损伤评分增大($P<0.05$);相较于 Heme+si-NC 组,Heme+si-NLRP12 组小鼠肺组织损伤有所改善,炎性细胞浸润减少、间质水肿减轻,肺损伤评分减小($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠肺组织细胞凋亡比较

如图 6、图 7 所示,与 Sham 组比较,Model 组小鼠肺组织细胞凋亡占比明显升高($P<0.05$);与 Model 组比较,Heme 组小鼠肺组织细胞凋亡占比进一步升高($P<0.05$);与 Heme+si-NC 组相比,Heme+si-NLRP12 组小鼠肺组织细胞凋亡占比明显降低($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠肺组织 PANoptosis 相关蛋白表达量比较

如图 8 所示,与 Sham 组比较,Model 组小鼠肺组织中 NLRP12、p-RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 蛋白表达量显著升高,Caspase-8 和 Bcl2 表达量降低($P<0.05$);与 Model 组比较,Heme 组小鼠肺组织中 NLRP12、p-RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 表达量进一步升高,Caspase-8 和 Bcl2 表达量进一步降低($P<0.05$),与 Heme+si-NC、Heme+si-NLRP12 组小鼠肺组织 NLRP12、p-RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 蛋白表达量下降,Caspase-8 和 Bcl2 表达量升高($P<0.05$)。



注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与游离血红素+阴性对照质粒转染组相比,^c $P<0.05$ 。

图 1 各组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平比较

Note. Compared with Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with Model group, ^b $P<0.05$. Compared with Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 1 Comparison of serum IL-6 and TNF- α levels among different groups of mice

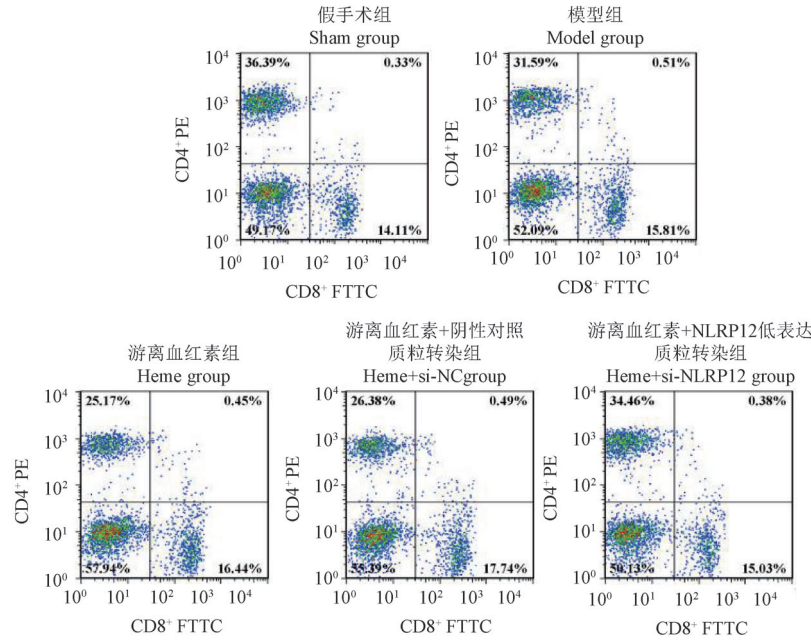
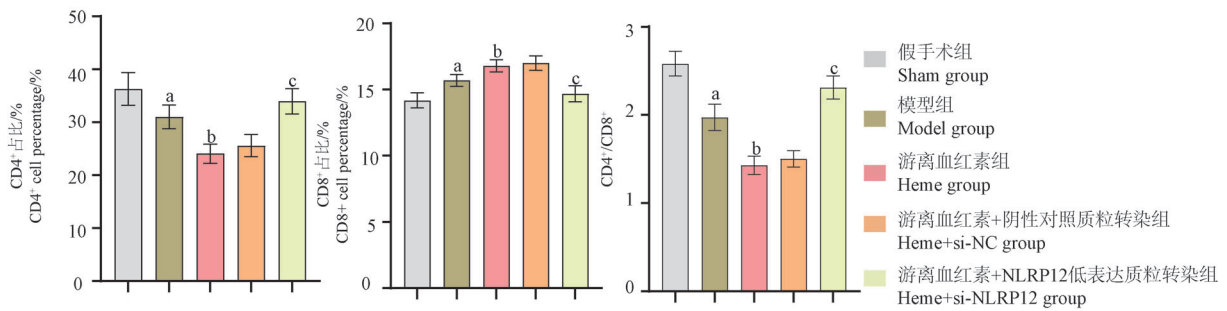


图 2 各组小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞分布

Figure 2 Distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in each group of mice



注:与假手术组相比, ^a $P < 0.05$;与模型组相比, ^b $P < 0.05$;与游离血红素+阴性对照质粒转染组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠血清 CD4⁺/CD8⁺ 对比

Note. Compared with Sham group, ^a $P < 0.05$. Compared with Model group, ^b $P < 0.05$. Compared with Heme+si-NC group, ^c $P < 0.05$.

Figure 3 Comparison of CD4⁺/CD8⁺ ratio in the blood serum of mice among different groups

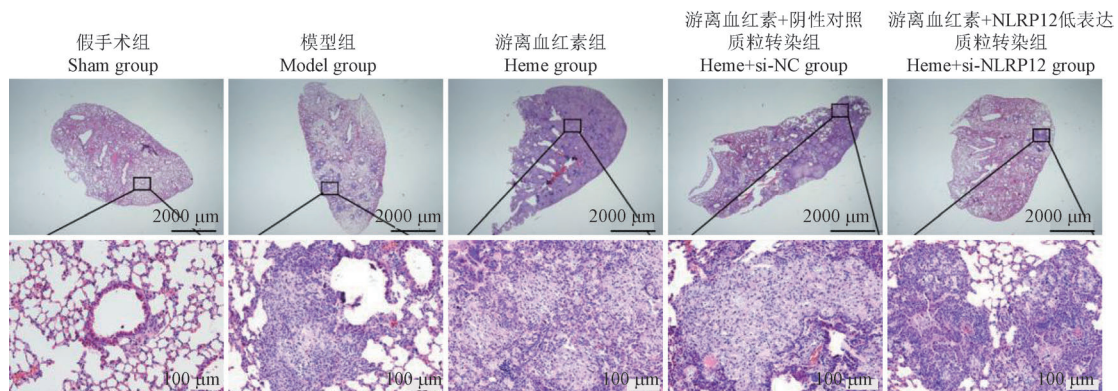
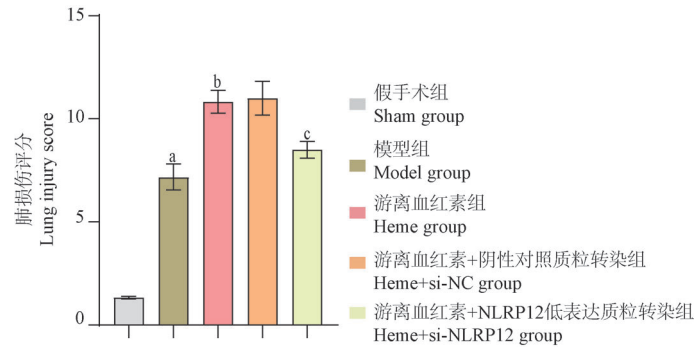


图 4 HE 染色检测肺组织病理变化

Figure 4 HE staining for detecting pathological changes in lung tissue



注:与假手术组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$;与游离血红素+阴性对照质粒转染组相比, ^c $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠肺组织损伤评分比较

Note. Compared with Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with Model group, ^b $P<0.05$. Compared with Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of lung tissue injury scores among different groups of mice

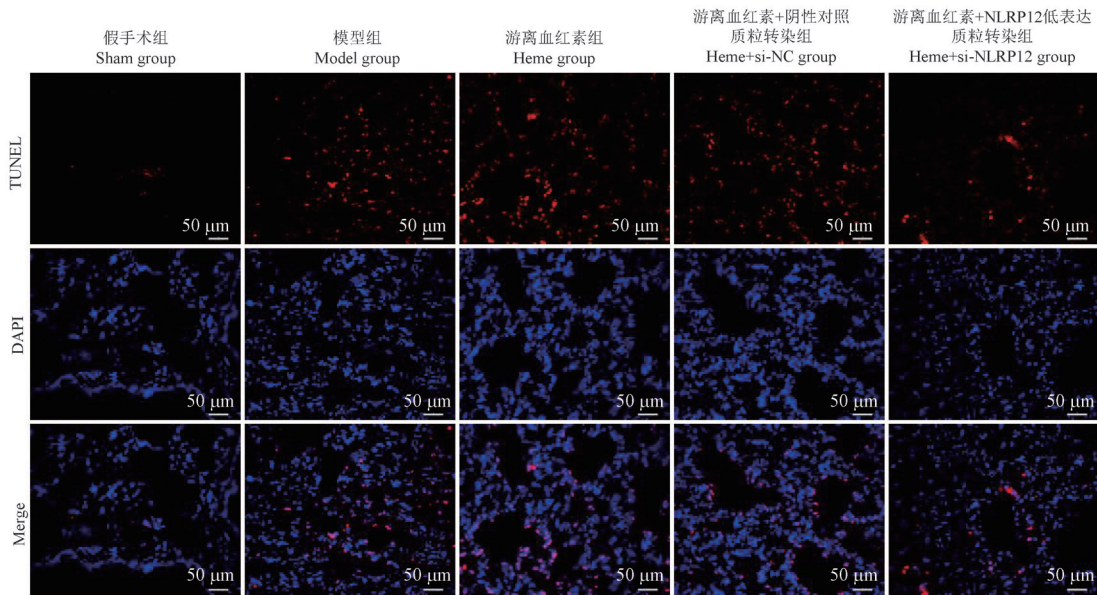
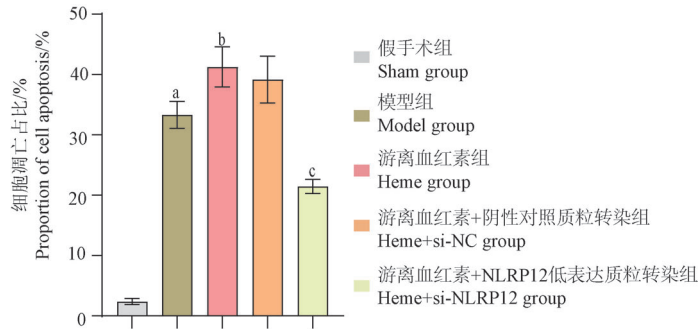


图 6 TUNEL 染色检测肺组织细胞凋亡($\times 200$)

Figure 6 TUNEL staining for detecting apoptosis of lung tissue cells ($\times 200$)



注:与假手术组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$;与游离血红素+阴性对照质粒转染组相比, ^c $P<0.05$ 。

图 7 各组小鼠肺组织细胞凋亡情况对比

Note. Compared with Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with Model group, ^b $P<0.05$. Compared with Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of apoptosis in lung tissue cells of mice in each group

2.6 各组 BMDM 存活率比较

如图 9 所示,与 Control 组比较,LPS 组 BMDM 存活率明显降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+Heme 组 BMDM 存活率进一步下降($P<0.05$),与 LPS+Heme+si-NC 组相比,LPS+Heme+si-NLRP12 组 BMDM 存活率显著升高($P<0.05$)。

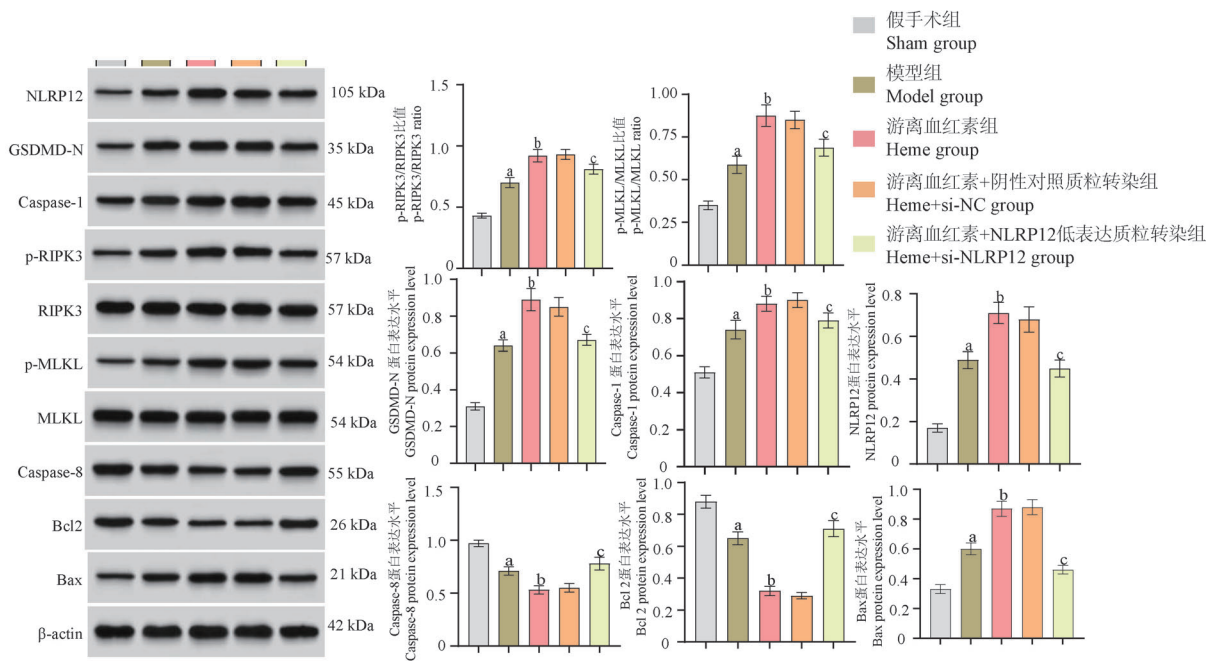
2.7 各组 BMDM 上清液炎症因子比较

如图 10 所示,与 Control 组比较,LPS 组 BMDM 上清液炎症因子水平明显升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+Heme 组上清液炎症因子水

平进一步升高($P<0.05$),与 LPS+Heme+si-NC 组相比,LPS+Heme+si-NLRP12 组上清液炎症因子水平明显下降($P<0.05$)。

2.8 各组 BMDM 凋亡率比较

如图 11 所示,与 Control 组比较,LPS 组 BMDM 凋亡率明显升高($P<0.05$);与 Model 组比较,LPS+Heme 组小鼠 BMDM 凋亡率进一步升高($P<0.05$),与 LPS+Heme+si-NC 组相比,LPS+Heme+si-NLRP12 组小鼠 BMDM 凋亡率明显降低($P<0.05$)。

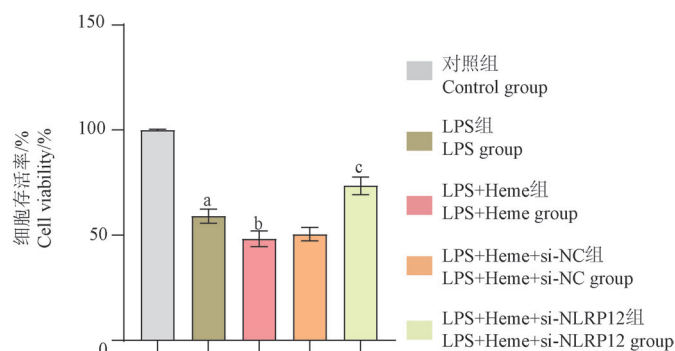


注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与游离血红素+阴性对照质粒转染组相比,^c $P<0.05$ 。

图 8 Western blot 检测各组小鼠肺组织泛凋亡相关蛋白表达水平比较

Note. Compared with Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with Model group, ^b $P<0.05$. Compared with Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 8 Comparison of PANoptosis related protein expression levels in lung tissue of mice in each group by Western blot



注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 LPS 组相比,^b $P<0.05$;与 LPS+Heme+si-NC 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 9 各组 BMDM 存活率比较

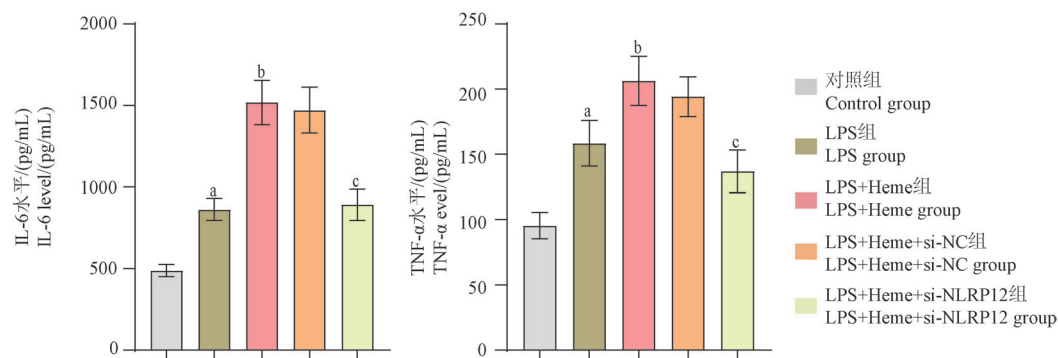
Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with LPS group, ^b $P<0.05$. Compared with LPS+Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 9 Comparison of BMDM survival rates among different groups

2.9 各组 BMDM 中 PANoptosis 相关蛋白表达量比较

如图 12 所示,与 Control 组比较,LPS 组 BMDM 中 NLRP12、p-RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 蛋白表达量显著升高,Caspase-8 和 Bcl2 蛋白表达量降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+Heme 组 BMDM 中 NLRP12、p-

RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 蛋白表达量进一步升高,Caspase-8 和 Bcl2 蛋白表达量进一步降低($P<0.05$),与 LPS+Heme+si-NC 组比较,LPS + Heme + si-NLRP12 组 BMDM 中 NLRP12、p-RIPK3/RIPK3、p-MLKL/MLKL、GSDMD-N 和 Bax 蛋白表达量下降,Caspase-8 和 Bcl2 蛋白表达量升高($P<0.05$)。

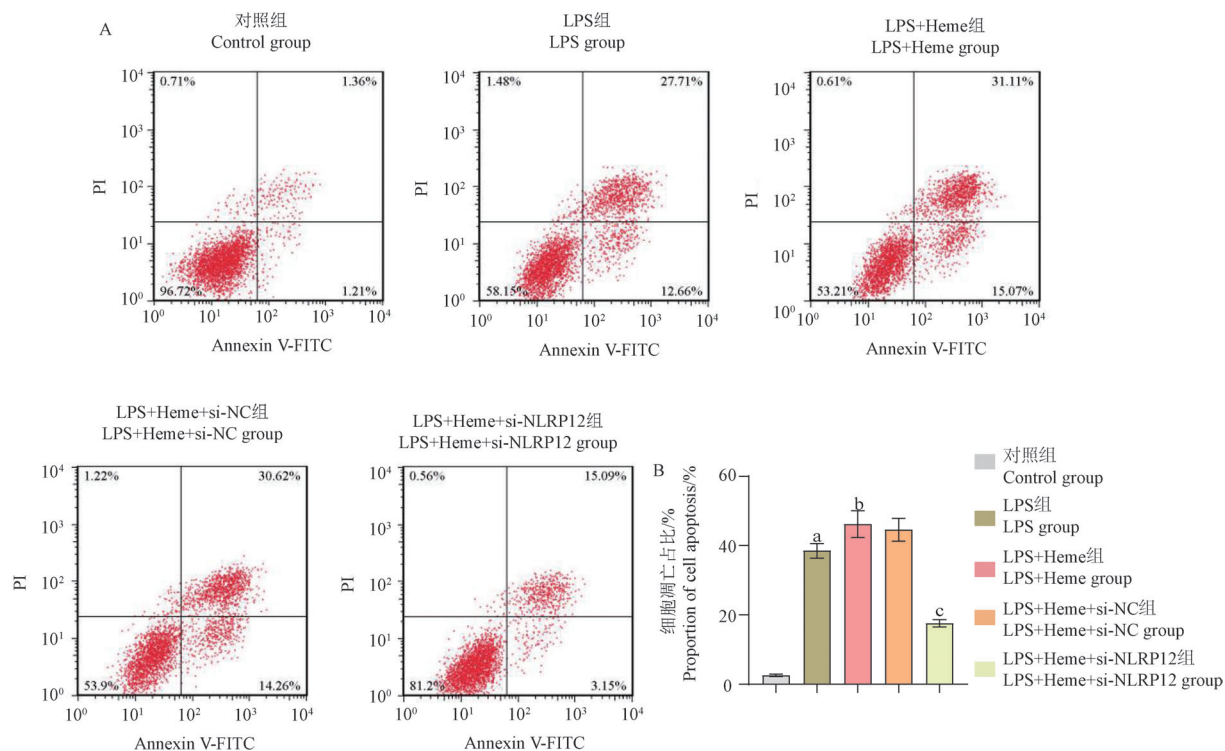


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 LPS 组相比,^b $P<0.05$;与 LPS+Heme+si-NC 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 10 各组 BMDM 上清液炎症因子比较

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with LPS group, ^b $P<0.05$. Compared with LPS+Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 10 Comparison of inflammatory factors in BMDM supernatant of each group

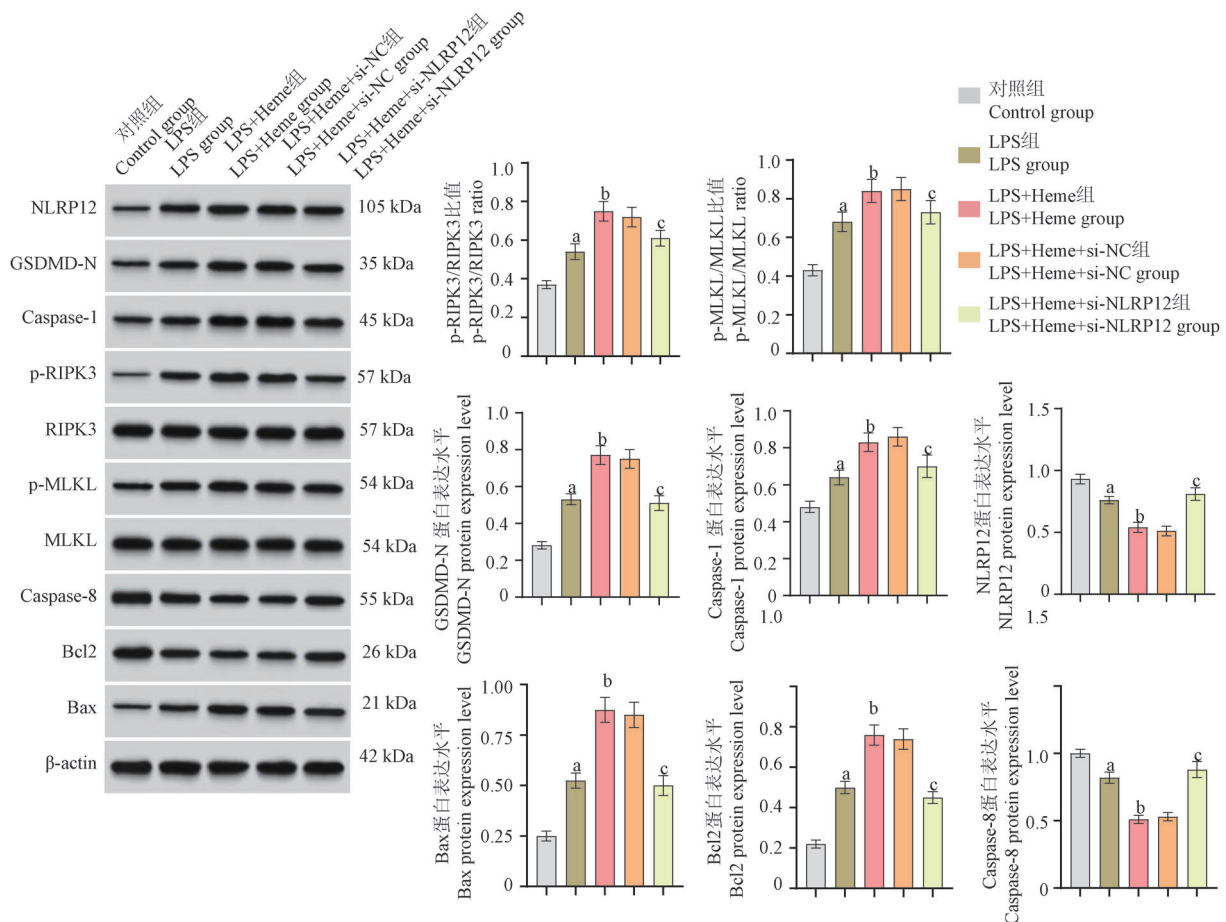


注:A:流式细胞图;B:细胞凋亡占比。与对照组相比,^a $P<0.05$;与 LPS 组相比,^b $P<0.05$;与 LPS+Heme+si-NC 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 11 流式细胞术检测细胞凋亡率

Note. A, Flow cytometry plots. B, Apoptotic cell percentage. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with LPS group, ^b $P<0.05$. Compared with LPS+Heme+si-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 11 Flow cytometry detection of cell apoptosis rate



注:与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组相比, ^b $P < 0.05$;与 LPS+Heme+si-NC 组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 12 Western blot 检测各组 BMDM 泛凋亡相关蛋白表达水平比较

Note. Compared with Control group, ^a $P < 0.05$. Compared with LPS group, ^b $P < 0.05$. Compared with LPS + Heme + si-NC group, ^c $P < 0.05$.

Figure 12 Comparison of expression levels of PANoptosis proteins in BMDM among different groups by Western blot

3 讨论

脓毒症可同时发生在两个阶段(包括初始免疫激活阶段和慢性免疫抑制阶段)^[16],由于宿主免疫系统无法完全恢复,从而导致初始感染后出现持续的免疫抑制。脓毒症免疫抑制是脓毒症后期常见的病理状态,其核心特征为免疫细胞功能受损(如细胞因子分泌失衡)、免疫细胞凋亡增加及继发感染风险升高等。目前,脓毒症患者的发病率仍持续增加且没有特异性的治疗方式,因此,了解其免疫抑制的机制对脓毒症的治疗至关重要。

脓毒症早期炎症因子及炎症小体激活细胞

程序性死亡途径,进而对细胞应激源和外来微生物病原体做出反馈,维持机体细胞免疫机制平衡;但持续性的炎症反应也会造成持久性的免疫抑制^[3]。Kanneganti 教授团队提出的 PANoptosis 是一种新发现的细胞程序性死亡,具有焦亡、凋亡和坏死性凋亡的关键特征^[17]。从免疫细胞耗竭角度来看, PANoptosis 可导致免疫细胞大量异常死亡,进而引发免疫抑制。如巨噬细胞作为固有免疫的关键细胞,其通过 PANoptosis 大量死亡后,吞噬病原体、分泌促炎因子等功能显著减弱,导致机体对感染的清除能力下降,从而陷入免疫抑制状态^[18]。研究表明,脓毒症模型发生 PANoptosis 样细胞死亡,阻断 PANoptosis 样细胞

死亡可缓解脓毒症诱导的肺损伤^[19]。NLRP12 是 NLR 家族的一员,在调节免疫反应(如抗病毒)过程中发挥关键作用^[20]。此外,NLRP12 在巨噬细胞中的特异性表达及其对细胞死亡信号具有较强的敏感性。研究表明,NLRP12-PANoptosome 途径与异常炎症细胞死亡相关的炎症和感染病密切相关^[21]。其中 Caspase-8 和 Bax 是促凋亡蛋白,Caspase-1 和 GSDMD-N 是焦亡相关的标志物,RIPK3 和 MLKL 的磷酸化水平是坏死性凋亡的关键步骤。最近的研究报告指出^[12],NLRP12 可通过形成 NLRP12-PANoptosome 复合体,进一步激活 Caspase-8 与 RIPK3 信号通路,最终驱动炎症细胞死亡的发生;而当 NLRP12 基因缺失时,小鼠的急性肾损伤得到改善,并显著降低致死风险。综合上述研究结果可得出,NLRP12 作为一种关键的胞质传感器,在 Heme 联合 PAMP 介导的 PANoptosis 激活、炎症反应调控及病理损伤发展过程中,发挥着不可或缺的作用。脓毒症的本质是全身性炎症反应综合征,肺、肝、肾、肠道等器官均会发生不同程度的损伤。肺组织中富含巨噬细胞(如肺泡巨噬细胞),而巨噬细胞是脓毒症中炎症反应和 PANoptosis 的核心效应细胞^[22]。本研究通过构建脓毒症免疫抑制小鼠模型,显示小鼠精神萎靡、活动减少、毛发蓬松无光泽,血清 CD4⁺ 占比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低、促炎因子水平异常升高、肺组织出现炎症细胞浸润,说明模型构建成功。以 Heme 干预后发现,相较于模型小鼠,Heme 干预后小鼠肺组织发生更加明显的病理损伤、血清炎症因子水平及肺组织细胞凋亡率增加,CD4⁺/CD8⁺ 比值降低,PANoptosis 相关蛋白表达量显著增加,以上结果提示 Heme 可促进脓毒症小鼠的 PANoptosis,加重了免疫抑制。进一步为了研究 Heme 与 NLRP12-PANoptosome 的关系,本研究在 Heme 干预小鼠的基础上尾静脉注射 NLRP12 低表达质粒,结果显示小鼠肺组织病理损伤得到明显改善、血清炎症因子水平、肺组织细胞凋亡率及 PANoptosis 过程减轻,CD4⁺/CD8⁺ 比值升高,表明 NLRP12 介导脓毒症免疫抑制和 PANoptosis 的发生。

巨噬细胞是机体抵抗病原微生物的第一道

防线,在识别、清除病原微生物及抗原的处理中发挥重要作用,其功能受到抑制则机体清除病菌能力降低^[23]。在脓毒症免疫抑制阶段,巨噬细胞系统功能降低^[24],因此,调节巨噬细胞的正常功能对提高脓毒症患者的生存率具有重要意义。本研究通过体外以 LPS 感染巨噬细胞诱导脓毒症病理模型,结果显示,LPS 组细胞活性降低、凋亡率及上清炎症因子水平显著升高,且 NLRP12 蛋白、凋亡相关蛋白(Bax、Caspase-8)、坏死性凋亡相关蛋白(p-MLKL/MLKL、p-RIPK3/RIPK3)及焦亡蛋白(Caspase-1、GSDMD-N)表达量显著升高,而 Heme 会加重这一现象,提示血红素调控 NLRP12 及相关因子的表达,加速巨噬细胞的死亡。同时本研究在 Heme 干预细胞的同时转染 si-NLRP12,结果显示细胞凋亡率、上清炎症因子水平及 PANoptosis 相关蛋白表达量显著下降,表明 NLRP12 介导 PANoptosome 的生成,而 Heme 可通过调控 NLRP12 的表达促进巨噬细胞 PANoptosis,增强免疫抑制。

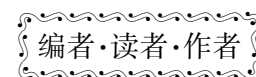
脓毒症免疫抑制状态下的巨噬细胞功能失调是一个多维度、多机制交织的主动适应过程,涉及表型极化失衡、抗原提呈缺陷、代谢重组、抑制性受体表达等多个层面。而 PANoptosis 炎症性死亡模式,通过直接清除效应细胞和间接重塑免疫微环境,触发了这一功能失调状态,并形成一个持续性的免疫抑制状态。在本研究中,Heme 可能通过上调 NLRP12 的表达促进巨噬细胞 PANoptosis,从而增强免疫抑制。本研究首次明确血红素通过上调 NLRP12 表达进而促使 NLRP12-PANoptosome 形成,诱导免疫细胞 PANoptosis,这为脓毒症的临床治疗提供新的治疗靶点和治疗手段。如临床可通过检测患者血液中 Heme 浓度及 PANoptosis 相关指标,评估疾病严重程度及预后;未来可通过研发 Heme 清除剂,通过减轻免疫细胞耗竭,改善脓毒症患者的免疫抑制状态;或寻找靶向 PANoptosome 分子的抑制剂,如阻断 RIPK1/RIPK3 相互作用的抑制剂,或抑制 Caspase-8 非凋亡功能的药物,通过破坏 PANoptosome 的组装抑制 PANoptosis,实现精准治疗。此外关于 Kanneganti 教授团队提出的 PANoptosis 途径还有 ZBP1-PANoptosomes、AIM2-

PANoptosomes 和 RIPK1-PANoptosomes,其在脓毒症免疫抑制中也有待深入研究。

参考文献:

- [1] LIU D, HUANG S Y, SUN J H, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 56–74.
- [2] GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J, ASCHENBRENNER A C, BAUER M, et al. The pathophysiology of sepsis and precision-medicine-based immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2024, 25(1): 19–28.
- [3] TORRES L K, PICKKERS P, VAN DER POLL T. Sepsis-induced immunosuppression [J]. *Annu Rev Physiol*, 2022, 84(6): 157–181.
- [4] MA M, JIANG W, ZHOU R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases [J]. *Immunity*, 2024, 57(4): 752–771.
- [5] CICCHINELLI S, PIGNATARO G, GEMMA S, et al. PAMPs and DAMPs in sepsis: a review of their molecular features and potential clinical implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 962–975.
- [6] BOZZA M T, JENEY V. Pro-inflammatory actions of heme and other hemoglobin-derived DAMPs [J]. *Front Immunol*, 2020, 11(1): 1323–1335.
- [7] ZEMTSOVSKI J D, TUMPARA S, SCHMIDT S, et al. Alpha1-antitrypsin improves survival in murine abdominal sepsis model by decreasing inflammation and sequestration of free heme [J]. *Front Immunol*, 2024, 15(1): 1–16.
- [8] QI Z, ZHU L, WANG K, et al. PANoptosis: Emerging mechanisms and disease implications [J]. *Life Sci*, 2023, 333(1): 122158–122170.
- [9] TULADHAR S, KANNEGANTI T D. NLRP12 in innate immunity and inflammation [J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76(1): 100887–100901.
- [10] 唐俊玉, 黄仁, 商燕, 等. 复方葶苈子汤干预 LPS 诱导的肺微血管内皮细胞 TLR2/4-NLRP12-PANoptosis 轴的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2025, 34(1): 23–27.
- TANG J Y, HUANG R, SHANG Y, et al. Experimental study on the intervention of compound Tinglizi decoction on the TLR2/4-NLRP12-PANoptosis axis in LPS-induced pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2025, 34(1): 23–27.
- [11] BERNARD E M, BROZ P. NLRP12 senses heme and PAMPs to drive necrotic cell death and inflammation [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(15): 2621–2623.
- [12] SUNDARAM B, PANDIAN N, MALL R, et al. NLRP12-PANoptosome activates PANoptosis and pathology in response to heme and PAMPs [J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2783–2801.
- [13] 周超, 温天明, 胥丽, 等. miR-140 靶向 PD-L1 在小鼠脓毒症免疫抑制中的作用 [J]. *西部医学*, 2021, 33(1): 10–15.
- ZHOU C, WEN T M, XU L, et al. The role of miR-140 targeting PD-L1 in the immunosuppression of sepsis in mice [J]. *Med J West China*, 2021, 33(1): 10–15.
- [14] 郭茜文, 尹紫悦, 程俊飞, 等. 氯化血红素对缺氧导致小鼠组织损伤的保护作用 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2023, 48(10): 1437–1444.
- GUO Q W, YIN Z Y, CHENG J F, et al. Protective effect of heme chloride on hypoxia-induced tissue injury in mice [J]. *J Cent South Univ Med Sci*, 2023, 48(10): 1437–1444.
- [15] 吴晓双, 安宁, 陈要臻, 等. 游离血红素直接致肝细胞损伤的研究 [J]. *临床输血与检验*, 2023, 25(4): 444–449.
- WU X S, AN N, CHEN Y Z, et al. The study on hepatocyte injury directly caused by free heme [J]. *J Clin Transfus Lab Med*, 2023, 25(4): 444–449.
- [16] WIERSINGA W J, VAN DER POLL T. Immunopathophysiology of human sepsis [J]. *EBioMedicine*, 2022, 86(1): 104363–104372.
- [17] PANDEYA A, KANNEGANTI T D. Therapeutic potential of PANoptosis: innate sensors, inflammasomes, and RIPKs in PANoptosomes [J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(1): 74–88.
- [18] LIU K, WANG M, LI D, et al. PANoptosis in autoimmune diseases interplay between apoptosis, necrosis, and pyroptosis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15(1): 1502855–1502867.
- [19] HE Y Q, DENG J L, ZHOU C C, et al. Ursodeoxycholic acid alleviates sepsis-induced lung injury by blocking PANoptosis via STING pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(2): 111161–111173.
- [20] JING H, SONG Y, DUAN E, et al. NLRP12 inhibits PRRSV-2 replication by promoting GP2a degradation via MARCH8 [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 298(1): 110271–110288.
- [21] SHARMA B R, KARKI R, RAJESH Y, et al. Immune regulator IRF1 contributes to ZBP1-, AIM2-, RIPK1-, and NLRP12-PANoptosome activation and inflammatory cell death (PANoptosis) [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(9): 105141–105151.
- [22] GONG D, LIU X, WU P, et al. Rab26 alleviates sepsis-induced immunosuppression as a master regulator of macrophage ferroptosis and polarization shift [J]. *Free*

- Radic Biol Med, 2024, 212(1): 271-283.
- [23] MUNDT S, GRETER M, BECHER B. The CNS mononuclear phagocyte system in health and disease [J]. Neuron, 2022, 110(21): 3497-3512.
- [24] SHI R, WANG J, ZHANG Z, et al. ASGR1 promotes liver injury in sepsis by modulating monocyte-to-macrophage differentiation via NF- κ B/ATF5 pathway [J]. Life Sci, 2023, 315(1): 121339-121352.
- [收稿日期]2025-08-05



《中国比较医学杂志》关于在论文写作与评审过程中使用生成式人工智能技术的声明

为顺应人工智能技术发展趋势,规范生成式人工智能(Generative Artificial Intelligence, GenAI)在科研与出版活动中的合理使用,保障学术论文的原创性、真实性、准确性与伦理合规性,《中国比较医学杂志》参照国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)推荐规范及国内相关学术出版共识,特制定本规定如下:

一、GenAI 使用的基本原则

1. GenAI 不具备作者身份:GenAI 工具及其产品、开发团队等不得作为论文作者署名。论文作者须为对研究内容及发表成果承担全部责任的自然人。
2. 禁止滥用 GenAI 撰写论文:作者不得使用 GenAI 撰写整篇论文或论文的核心部分(如研究方法、结果、讨论等)。所有属于科学贡献和智力劳动的内容须由作者独立完成。
3. 禁止操纵研究与数据:不得使用 GenAI 技术篡改、伪造研究过程、数据、图表、影像及音频视频资料,否则将被视为严重学术不端行为。

二、作者使用 GenAI 的披露与责任

作者如使用 GenAI 辅助研究或写作(如语言润色、数据整理、文献检索等),须履行以下义务:

1. 在"作者贡献声明"中明确披露 GenAI 使用情况,包括:
 - 所用 GenAI 工具名称、版本及使用时间;
 - 使用目的、方法及提示词(prompt);
 - 生成内容在论文中的具体体现(如段落、图表等)。
2. 作者须对 GenAI 生成内容进行专业审查、修改与核实,并对相关内容的真实性与准确性承担全部责任。
3. 建议将 GenAI 辅助生成的内容作为补充材料提交,供审稿与编辑核查。

三、论文评审中禁止使用 GenAI

1. 审稿人、编辑不得使用 GenAI 工具进行稿件的评审、修改或内容生成。
2. 严禁将稿件及补充材料上传至公开 GenAI 平台,以防侵犯知识产权、泄露隐私或保密信息。
3. 如审稿人怀疑作者违反 GenAI 使用规定,须在评审意见中向编辑部说明。

四、违规处理

1. 作者如违反本规定,一经查实,将被退稿或撤稿。
2. 审稿人或编辑如违规使用 GenAI 导致信息泄露或侵权,将被取消审稿或编辑资格,并依法依规追究责任。

五、附则

本规定自发布之日起执行。《中国比较医学杂志》将持续关注 GenAI 技术发展,并根据实际情况适时修订本政策。

《中国比较医学杂志》编辑部