

717 解毒合剂通过 NETs-CYR61/CCN1 信号通路对蝮蛇咬伤大鼠局部组织损伤修复作用

董德刚¹, 杨悦², 郑向龙², 毛文丽³, 宋梅⁴, 严张仁^{3*}, 王万春^{3*} (1. 江西中医药大学生命科学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院中医外科, 南昌 330006; 3. 南昌医学院公共学科教学部, 南昌 330004)

摘要:目的 探究 717 解毒合剂对蝮蛇咬伤大鼠局部组织中中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)水平,以及对富含半胱氨酸蛋白 61(CYR61/CCN1)表达的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为正常对照组、蝮蛇咬伤组及抗蝮蛇毒血清组及 717 解毒合剂高、低剂量组。收集血清、大腿腓肠肌,采用苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin staining, HE)和马松(Masson)染色观察各组腓肠肌病理学变化,透射电镜观察腓肠肌超微结构,原位末端凋亡(TUNEL)法检测各组大鼠腓肠肌细胞凋亡情况,PicoGreen 荧光检测各组血清游离 DNA(cf-DNA)水平,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组血清与腓肠肌中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达水平,免疫组化检测腓肠肌中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)的改变,免疫荧光法检测各组大鼠腓肠肌瓜氨酸化组蛋白 H3(CitH3)水平,Western blot 与聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测腓肠肌组织 CYR61/CCN1 蛋白及其 mRNA 表达情况。结果 与正常组比较,模型组出现显著的炎症浸润与出血反应,且胶原纤维化程度均升高;超微结构显示模型组大鼠腓肠肌细胞结构损伤严重,肌节呈非对称性分布,肌原纤维丝断裂;并分布有大量凋亡细胞,血清 cf-DNA、MPO 含量显著上升($P < 0.01$),腓肠肌 MPO 及 CitH3 蛋白表达均有升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),腓肠肌 CYR61/CCN1 蛋白及其 mRNA 表达均有上调;717 解毒合剂各给药组均能显著改善大鼠局部炎症反应及出血症状,降低胶原纤维化程度,有效抑制蝮蛇咬伤大鼠腓肠肌细胞凋亡率,减少血清 cf-DNA、MPO 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),717 解毒合剂高剂量组抑制了腓肠肌 NE、MPO 的表达,717 解毒合剂各给药组均能降低腓肠肌 CitH3 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抑制了 CYR61/CCN1 蛋白及其 mRNA 高表达。结论 蝮蛇毒诱导局部组织中中性粒细胞 NETs 形成,CYR61/CCN1 地过表达,717 解毒合剂改善了大鼠腓肠肌超微结构,抑制了细胞凋亡,并可能通过调控 NETs-CYR61/CCN1 信号通路改善蛇伤症状,NETs 信号分子及 CYR61/CCN1 有望成为蝮蛇毒致局部组织损伤防治的新靶点。

关键词:717 解毒合剂;蝮蛇咬伤;中性粒细胞胞外陷阱;细胞外基质;富含半胱氨酸蛋白 61;局部组织

doi:10.11669/cpj.2024.02.007 中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)02-0151-10

Effect of 717 Jiedu Decoction on Local Tissue Damage Repair of Rats After *Agkistrodon halys* Bite Through NETs-CYR61/CCN1 Signaling Pathway

DONG Degang¹, YANG yue², ZHENG Xianglong², MAO Wenli³, SONG Mei⁴, YAN Zhangren^{3*}, WANG Wanchun^{3*} (1. School of Life Sciences, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Department of TCM Surgery, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Department of Public Science, Nanchang Medical College, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of 717 Jiedu decoction on neutrophil extracellular traps (NETs) and CYR61/CCN1 expression in local tissue of rats after *Agkistrodon halys* bite. **METHODS** SD rats were randomly divided into normal control group, *Agkistrodon halys* bite group and high-dose and low-dose 717 Jiedu decoction groups. The serum and thigh gastrocnemius were collected, and the pathological changes of gastrocnemius in each group were observed by Hematoxylin-Eosin staining(HE) and Masson staining, the ultrastructure of gastrocnemius in each group was observed by transmission electron microscopy, the apoptosis of gastrocnemius cells in each group was detected by TUNEL method, and the serum circulating-free cell (cf-DNA) level was detected by PicoGreen fluorescence. The expression levels of myeloperoxidase (MPO) in serum and gastrocnemius were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the change of neutrophil elastase (NE) in gastrocnemius was detected by immunohistochemistry, and

基金项目:国家自然科学基金地区项目资助(81360288、81960874、82260937);江西省自然科学基金重点项目资助(20202ACB206010);江西中医药大学首批科技创新团队资助项目资助(CXTD22009);江西省教育厅科技一般项目资助(GJJ201236);江西中医药大学中西医结合一级学科资助(江西省双一流学科,zxyylk20220103)

作者简介:董德刚,男,副教授,硕士生导师 研究方向:中药药理与毒理 * **通讯作者:**王万春,男,教授 研究方向:毒蛇咬伤的临床与基础 Tel:(0791)86362691;严张仁,男,教授 研究方向:中医外科学 Tel:(0791)86362691

the level of citrullinated histone H3 (CitH3) in gastrocnemius was detected by immunofluorescence. The expressions of Cyr61/CCN1 protein and its mRNA in gastrocnemius were detected by Western blot and PCR. **RESULTS** Compared with the normal group, the model group showed significant inflammatory infiltration and bleeding reaction, and the degree of collagen fibrosis increased. Ultrastructure showed that the structure of gastrocnemius cells in the model group was seriously damaged, and the distribution of muscle segments was asymmetrical. The contents of cf-DNA and MPO in serum were significantly increased ($P < 0.01$), the protein expressions of MPO and CitH3 in gastrocnemius were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the protein and mRNA expressions of Cyr61/CCN1 in gastrocnemius were up-regulated. All the administration groups of 717 Jiedu decoction significantly improved the local inflammatory response and bleeding symptoms of rats, reduced the degree of collagen fibrosis, effectively inhibited the apoptosis rate of gastrocnemius cells of pit viper bitten rats, and reduced the contents of cf-DNA and MPO in serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expressions of NE and MPO in gastrocnemius were inhibited in the high-dose 717 Jiedu decoction group, and the expression of CitH3 in gastrocnemius muscle was decreased in all administration groups of 717 Jiedu decoction ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the high expression of Cyr61/CCN1 protein and its mRNA was inhibited. **CONCLUSION** The venom of *Agkistrodon halys* can induce the formation of neutrophil NETs in local tissue and the overexpression of Cyr61/CCN1. The 717 Jiedu decoction could improve the ultrastructure of gastrocnemius muscle and inhibit cell apoptosis, which may also improve snitch symptoms by regulating the NETs-Cyr61/CCN1 pathway. The signaling molecules of NETs and Cyr61/CCN1 are expected to be new targets for the prevention and treatment of local tissue damage caused by *Agkistrodon halys* venom. **KEY WORDS:** 717 Jiedu decoction; *Agkistrodon halys* bite; neutrophil extracellular trap; extracellular matrix; Cyr61/CCN1; local tissue

毒蛇咬伤是一类严重危害人类健康的危重症。据统计,毒蛇咬伤影响了世界热带和亚热带地区的数百万人,全世界每年约有 500 万人被蛇咬伤,其中超过 10 万人死亡,多达 40 万人截肢和永久性缺陷^[1]。蝮蛇是我国主要蛇伤蛇种,蝮蛇咬伤占江西省毒蛇咬伤的 88% 以上^[2]。其毒性程度高,如未获得及时或有效医治,轻者致残,重者危及生命。随着气温的逐年升高,蝮蛇咬伤事件发生率已呈上升趋势,而我国基层地区以老弱幼为主,不少蛇伤患者预后仍不理想。蝮蛇咬伤能引起出血、水肿、疼痛及肌坏死等显著局部损伤效应。抗蛇毒血清能显著降低了毒蛇咬伤的死亡率,但在治疗蛇咬伤引起的局部病理效应方面是有限的^[3-4]。寻找蝮蛇咬伤局部组织损伤有效治疗方法已成为临床急需。

近年来,在毒液诱导的组织损伤研究方面取得了重大成果,包括所涉及的毒素筛选与鉴定,以及局部组织对毒液应激反应等方面。但蛇毒诱导局部组织损伤的确切机制尚不明确^[5]。中性粒细胞是机体最重要的炎性细胞,通过释放嵌入瓜氨酸化组蛋白 H3(citrullinated histone H3, CitH3)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和细胞外染色质等产生类似于渔网的纤维结构,称为中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)。现有研究证实,中性粒细胞是第 1 个到达蛇伤组织的炎症细胞,迅速募集并激活,产生包括趋化性、炎症介质合成、活性氧以及 NETs 形成等效应,NETs 在蛇毒诱导的局部组织损伤发生与修复过程中起关键作用^[6]。

本研究前期实验证实蝮蛇毒能引起炎症反应与氧化应激显著的局部组织损伤,经验方 717 解毒合剂能显著改善局部损伤症状,降低血清中透明质酸(HA)、IV 型胶原(Col-IV)、层粘连蛋白(LN)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分含量,加快创面愈合^[7-8]。ECM 是一种高度动态和复杂的网络结构,几乎存在于所有组织中,是细胞赖以生存的微环境,ECM 与细胞相互作用以调节多种功能,包括分化、增殖和迁移。中性粒细胞是重要的免疫细胞,在炎症期间协调一系列复杂事件中发挥关键作用。中性粒细胞还可以通过提供特定的基质重塑酶(如中性粒细胞弹性蛋白酶和金属蛋白酶)、产生 NETs 来介导 ECM 重塑,ECM 也可以通过调节中性粒细胞的功能来重塑炎症微环境,从而驱动疾病进展^[9]。

富含半胱氨酸 61(cysteine rich 61, Cyr61/CCN1)是一种 ECM 相关蛋白,可发挥多种生理功能,包括介导 ECM 的形成、细胞增殖、分化和黏附,以及创面愈合、组织修复和血管形成等^[10-11]。Cyr61/CCN1 是一种新型促炎因子,异常表达的 CCN1 与多种病理有关,包括各种急慢性炎症、组织纤维化及肿瘤等,尤其涉及伤口愈合的稳态、炎症、增殖和重塑各个阶段^[10,12]。但其在毒蛇咬伤进展中作用机制尚不清楚。本实验将以蝮蛇咬伤为研究对象,围绕 NETs-Cyr61/CCN1 信号通路,探讨 717 解毒合剂抗蝮蛇咬伤局部组织损伤作用及其可能机制,以期探寻治疗蛇伤局部损伤的新靶点,为中医药治疗蛇伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠40只(体质量180~220 g),雌雄各半(湖南斯莱克景达实验动物有限公司),许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养条件:温度20~26℃,湿度:40%~70%。各12 h明暗周期的饲养室,普通饲料喂养,自由进食和饮水。

1.2 药物、试剂与仪器

蝮蛇毒(福建龙海市春林农场,批号:20150927);717解毒合剂(院内制剂,批号:040843,组方:金银花-野菊花-紫花地丁-蒲公英-黄连-黄柏-半边莲-七叶一枝花-蝉蜕-防风-白芷-生大黄-车前草=3:3:3:3:2:2:3:3:2:2:2:2:3,广东一方制药公司),按比例配制成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 悬液进行灌胃,超声振荡30 min,生药定容浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。所制颗粒各项指标均等符合2020年版《中国药典》一部附录I C颗粒剂项下要求。

Masson染色液(货号:G1006,武汉Servicebio公司);丽春红酸性品红染色液(货号:R23039,上海源叶生物公司);苏木精-伊红染色液(货号:G1100)、PicoGreen dsDNA(货号:P9740)、TUNEL试剂盒(货号:G1501)(北京索莱宝公司);髓过氧化物酶(MPO,货号:MM-0337R1)、中性粒细胞弹性蛋白酶(Neutrophil Elastase, NE)(货号:MM-0306R1)(上海酶联生物科技有限公司);瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)(货号:ab5103)、 β -tubulin一抗(货号:ab21057)(英国Abcam公司);Neutrophil Elastase一抗(货号:AF0010,美国Affinity公司);CYR61(货号:DF6250,武汉Proteintech公司);山羊抗兔IgG cy3(货号:AS007,武汉ABdonal公避开);PVDF膜(IPVH00010,美国Millipore公司);抗蝮蛇毒血清(批号:20210404,上海赛伦生物,每支6000 u);其他均为国产分析纯。

病理切片机(型号:RM2016,上海徠卡公司);分析天平(BS110S,北京赛多利斯公司);脱水机(Donatello,意大利DIAPATH公司);包埋机(JB-P5,武汉俊杰电子公司);透射电子显微镜(HT7700)、光学显微镜(CX43)、荧光显微镜(CKX53)(日本OLYMPUS公司);多功能酶标仪(S/N502000011,瑞士TECAN公司);高速冷冻离心机(Biofuge stratos,德国Hereaus公司);凝胶成像分析仪(WD-9413)、蛋白垂直电泳仪(DYY-6C)(北京六一生物科技有限公司);超高灵敏度化学发光成像系统(Chemi DocTM XRS+,上海伯乐生命医学),荧光定量PCR仪

(PRISM 7700,美国ABI)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

SD大鼠适应性喂养1周后,随机分成5组:正常对照组(control);蝮蛇咬伤模型组(model);抗蝮蛇毒血清组(serum)及717解毒合剂低(717JD-L)、高剂量组(717JD-H),每组8只。除正常对照组以外,其余各组均用蝮蛇毒制成蝮蛇咬伤动物模型。

717解毒合剂各组在造模前6 d给药生药量 $1.65、3.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (分别为临床给药量的6与12倍),每天灌胃给药1次,共6 d。control组给予正常饮食及灌胃等体积生理盐水。

serum组自注射蛇毒后2 h开始给药,将血清(离心管中为1 mL)用0.9%氯化钠生理盐水稀释8倍,获得8 mL蛇毒血清稀释液,按每只0.6 mL尾静脉注射。

2.2 动物造模与取样^[8]

蝮蛇毒在临用前以生理盐水作溶媒配制为 $0.05\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蝮蛇毒溶液,造模时大鼠按 $0.0025\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体质量进行肌肉注射。将大鼠左后肢剪毛,再将蝮蛇毒溶液注射至大鼠左后肢腓肠肌,注毒后棉签压迫进针口约10 s,伤口匀涂碘伏消毒。control组注射等量生理盐水。

造模成功:大鼠未死亡,只限中毒症状,于注射后5 min左右局部变为青色,行走不利,个别大鼠有躁狂症状,注射后1 h左右局部变为暗紫色,肿硬,甚则水肿水疱,行动迟缓。约4 h后大鼠毛发竖起,无光泽,弓背,精神萎靡,活动明显减少。

各组在造模成功24 h后取样,各组取样前均禁食过夜,按照 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重腹腔内注射质量分数3%戊巴比妥钠溶液麻醉后,经腹主动脉抽取空腹血4 mL,静置1 h后 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,获得血清,处死后摘取各组腓肠肌,取少量置4%多聚甲醛进行固定,其余腓肠肌经液氮速冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.3 腓肠肌的病理学变化

取大鼠腓肠肌组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h后,常规石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡,乙醇梯度水洗,常规苏木精-伊红(HE)染色,树胶封片。HE染色时,石蜡切片于二甲苯脱蜡,酒精梯度水洗,苏木精染色,盐酸乙醇分化,伊红染色,用乙醇脱水,二甲苯透明、树胶封片;马松Masson染色时,常规脱水包埋,切片脱蜡,Weigert铁苏木素,体积分数1%盐酸乙醇分化,丽春红酸性品红染液染,磷钼

酸溶液 5 min, 苯胺蓝复染, 体积分数 1% 冰乙酸处理, 乙醇多次脱水, 二甲苯透明, 树胶封固。镜检。

2.4 腓肠肌超微结构观察

取上述部分腓肠肌置于预冷的生理盐水中洗净血污后, 切取 1 mm × 1 mm × 1 mm, 迅速投入电镜固定液 4 °C 固定 2 ~ 4 h。磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 体积分数 1% 的锇酸 0.1 mol · L⁻¹ pH 7.4 PBS 室温固定 2 h。PBS 漂洗, 常规组织脱水、渗透、包埋、切片, 铀铅双染色, 透射电镜观测。

2.5 原位末端凋亡 (Tunel) 法检测腓肠肌细胞凋亡情况

选取视腓肠肌部位蜡块切片, 烤片后脱蜡至水, 蛋白酶 K 修复, PBS 冲洗, TUNEL 反应液 37 °C 孵育 22 min, PBS 冲洗后, 切片稍甩干后在圈内滴加破膜工作液覆盖组织, 常温下孵育 20 min, PBS 冲洗后室温平衡, 按片子数量和组织大小取 TUNEL 试剂盒内适量末端脱氧核糖核酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdTase), dUTP, buffer 按 1: 5: 50 比例混合, 加到圈内覆盖组织, 切片平放于湿盒内, 37 °C 恒温箱孵育 2 h, 湿盒内加少量水保持湿度, 去除 PBS 后在圈内滴加 4', 6-联脒-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液, 避光室温孵育 10 min, 用抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察, 波长 330 ~ 380 nm。

2.6 PicoGreen 荧光检测各组血清 cf-DNA 水平

采用 PicoGreen 试剂盒测定, 用已知浓度的小牛胸腺嘧啶 DNA (TE 缓冲液配置) 作为标准品工作液。取稀释 10 倍后的血清 50 μL 加入黑色 96 孔微孔板, 加入 50 μL 经 200 倍稀释的 PicoGreen 染料工作溶液, 室温孵育 10 min 后, 以 TE 缓冲液为空白, 激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm, 测定样品和 control 组的荧光值。依据标准品曲线计算血清样品 cf-DNA 浓度。

2.7 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清与腓肠肌中 MPO 的变化

将各组腓肠肌组织按照质量 (g): 体积 (mL) = 1: 9 加入生理盐水进行组织匀浆, 10 000 r · min⁻¹ 离心 8 min, 获得上清, ELISA 法检测血清以及腓肠肌 MPO 含量, 严格按照说明书步骤进行。

2.8 免疫组化检测腓肠肌中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE) 的改变

将大鼠腓肠肌组织石蜡切片予以常规脱蜡脱水后, 将切片放入切片架中, 加入柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0), 加热煮沸进行高压抗原修复后自然冷却, 弃去抗原修复液, 将切片用 PBS (pH 7.4) 淋洗;

加入体积分数 3% 双氧水去除内源性过氧化物酶, 室温孵育 10 min, PBS 充分淋洗。PBS 浸洗玻片 3 次, 每次 5 min, 吸水纸吸干组织周围的 PBS, 在玻片上滴加 5% BSA, 37 °C 封闭 30 min。用吸水纸吸掉组织周围的封闭液, 每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗: Neutrophil Elastase (1: 100); 4 °C 孵育过夜, 结合山羊抗兔 (1: 100), 经 DAB 显色、封片, 镜下观察阳性表达情况。

2.9 免疫荧光法检测各组大鼠腓肠肌 CitH3 水平

将大鼠腓肠肌组织石蜡切片予以常规脱蜡脱水后, 将切片放入切片架中, 加入柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0), 加热煮沸进行高压抗原修复后自然冷却, 弃去抗原修复液, 将切片用 PBS 淋洗, 体积分数 0.5% TritonX-100 室温通透 20 min。PBS 浸洗玻片 3 次, 每次 5 min, 吸水纸吸干组织周围的 PBS, 在玻片上滴加质量分数 5% BSA, 37 °C 封闭 30 min。用吸水纸吸掉组织周围的封闭液, 每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗: CitH3 (1: 200); 4 °C 孵育过夜, 滴加二抗 Cy3 (1: 200), 湿盒中在较暗处 37 °C 孵育 45 min。PBS 充分淋洗, 滴加 DAPI 避光孵育 3 min, 对本标本进行染核, 用 PBS 冲洗多余的 DAPI, 水冲洗, 吹干、封片、镜检。

2.10 Western blot 检测腓肠肌组织 Cyr61 蛋白表达情况

剪取少量腓肠肌加入用裂解液裂解, 离心 15 min, 收集上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 将分离的蛋白电转移至 PVDF 膜上。封闭液室温封闭 1 h, 加入一抗孵育 (1: 1 000), 4 °C 过夜。TBS 充分洗膜后, 加入二抗 (1: 2 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 发光液, 显影、洗片、晾干。凝胶成像仪扫描, 并采用 Quantity one 软件对其进行光密度分析, 以 β-tubulin 作为内参, 进行灰度分析, 蛋白表达量用目的蛋白/β-tubulin × 100% 表示。

2.11 PCR 技术检测腓肠肌组织 Cyr61 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取腓肠肌组织的 RNA, 利用 Primer 5.0 软件合成引物, Cyr61 上游引物 5'-ACTTCATGGTCCCAGTGCGC-3', 下游引物 5'-AAATCCGGGTTTCTTTCACA-3'; 内参 GAPDH 基因上游引物 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3', 下游引物 5'-ATGACCTTGCCCACAGCCT-3'。加入目的基因引物后, 用试剂盒扩增 PCR 产物, 质量分数 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 采用 Quantity One 软件进行灰度值分析。用 Sequence Detection Software version 软件检

测样本循环阈值 (cycle threshold, Ct) 值, 经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。

2.12 统计学处理

应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 定量结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间定量数值比较采用独立样本 t 检验, 比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异显著。

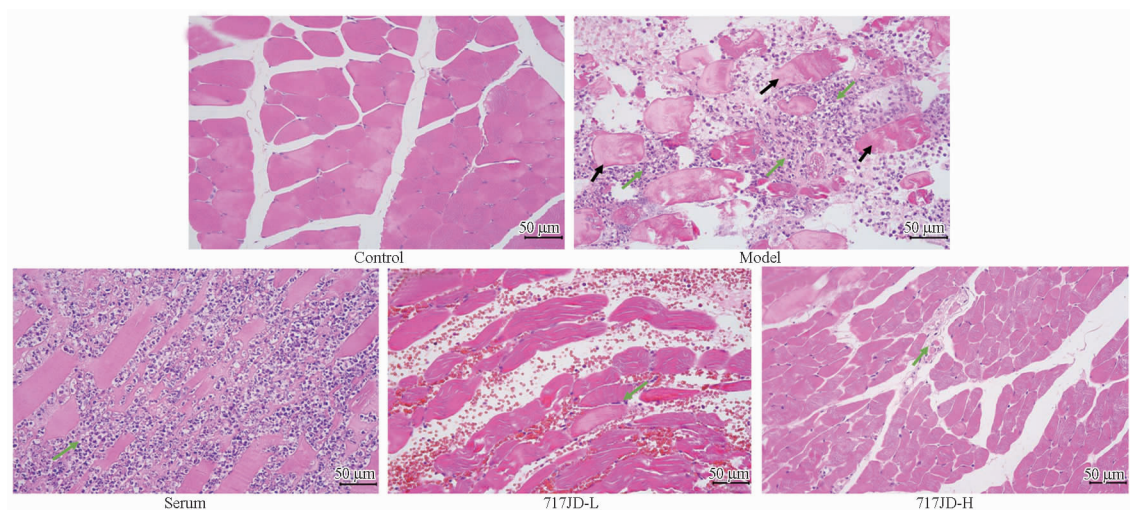
3 结果与分析

3.1 各组大鼠腓肠肌病理学变化

HE 染色结果显示, control 组腓肠肌组织结构完整, 肌细胞排列整齐, 细胞间隙小, 无炎症细胞浸润、出血现象; model 组创面肌肉组织结构紊乱, 肌细胞

变性坏死严重、细胞间隙变宽, 炎症细胞浸润明显, 出血严重; serum 组肌纤维损伤有所减轻, 偶见正常细胞, 但胞浆质化, 炎症细胞浸润明显; 717JD-L 组细胞核聚集与炎性浸润减轻, 正常细胞数增多; 717JD-H 组腓肠肌结构较为完整, 细胞间隙变小, 炎症细胞减少 (图 1)。

Masson 染色显示, 胶原纤维为蓝色表达, 肌纤维、胞质、纤维素、角蛋白及红细胞为红色表达; 经胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF) 计算胶原组织所占比例, 与 control 组比较, 其余各组胶原纤维化程度均升高 (均有 $P < 0.01$); 各给药组与 model 组比较纤维化有显著下降 (均有 $P < 0.01$), 且 717JD-H 组改善作用明显优于 serum 组, 见图 2。

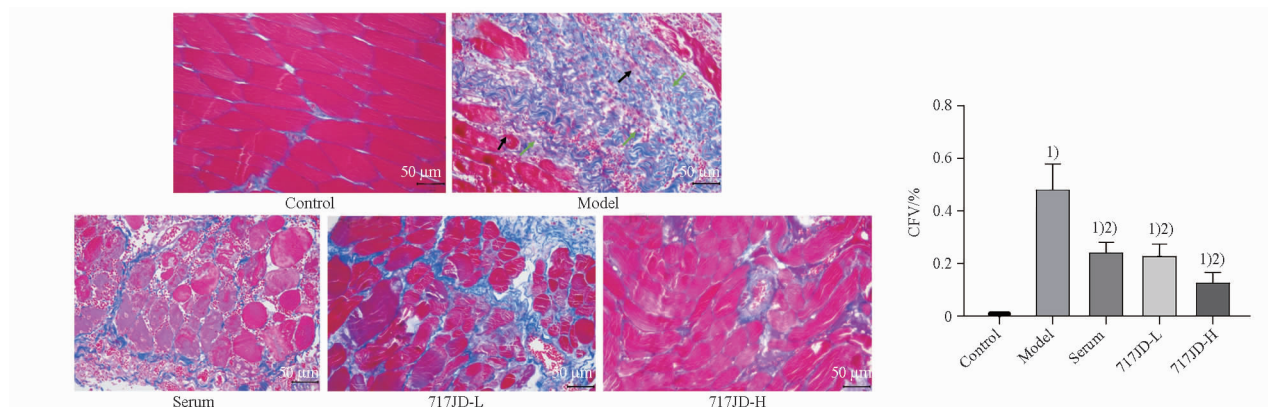


绿色箭头 - 炎症细胞浸润; 黑色箭头 - 出血。

Green arrows - inflammatory cell infiltration; Black arrows - bleeding.

图 1 各组大鼠腓肠肌组织苏木素-伊红 (HE) 染色结果 ($\times 400$)

Fig. 1 HE staining results of gastrocnemius tissue of rats in each group ($\times 400$)



绿色箭头 - 胶原纤维; 红色箭头 - 肌纤维、胞质、纤维素、角蛋白及红细胞; 与正常对照组比较, $^1)P < 0.01$; 与模型组比较, $^2)P < 0.01$ 。

Green arrows - collagen fibers; Red arrows - head muscle fibers, cytoplasm, cellulose, keratin, and red blood cells; $^1)P < 0.01$, compared with control group; $^2)P < 0.01$, compared with model group.

图 2 各组腓肠肌组织马松 (Masson) 染色结果 ($\times 400$). $n = 8, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Masson staining results of gastrocnemius tissue in each group. $n = 8, \bar{x} \pm s$

3.2 各组大鼠腓肠肌超微结构变化

超微结构显示,control 组大鼠腓肠肌细胞结构正常,细胞质均匀,细胞器数量正常,肌纤维排列整齐,粗细均一,肌节呈对称性分布,肌原纤维丝大多结构致密。model 组腓肠肌细胞结构损伤相对严重,细胞膜大面积破损、崩解,整体呈坏死征象,细胞质大面积溶解,细胞器数量减少,大多肿胀、游离,纤维溶解、松散,局部断裂,少量粗细不均,肌节呈非对称性分布,肌原纤维丝断裂。serum 组腓肠肌细胞呈明显水肿,

细胞器明显肿胀、变大,肌纤维局部断裂,大面积肌纤维松散,细胞质稀疏,细胞器数量明显减少,肌原纤维丝稀疏、溶解。717JD-L 组腓肠肌细胞呈明显水肿,细胞器明显肿胀、变大,肌纤维局部断裂,大面积融合变粗,肌节呈对称性分布,肌原纤维丝大多结构致密,小区域断裂。717JD-L 组腓肠肌细胞呈轻度水肿,细胞器轻度肿胀,少量变大,肌纤维结构致密,局部明显变粗,细胞质稀疏,细胞器数量较多,局部基质变淡,部分严重者呈灶性改变,膜内可见髓样结构(图 3)。

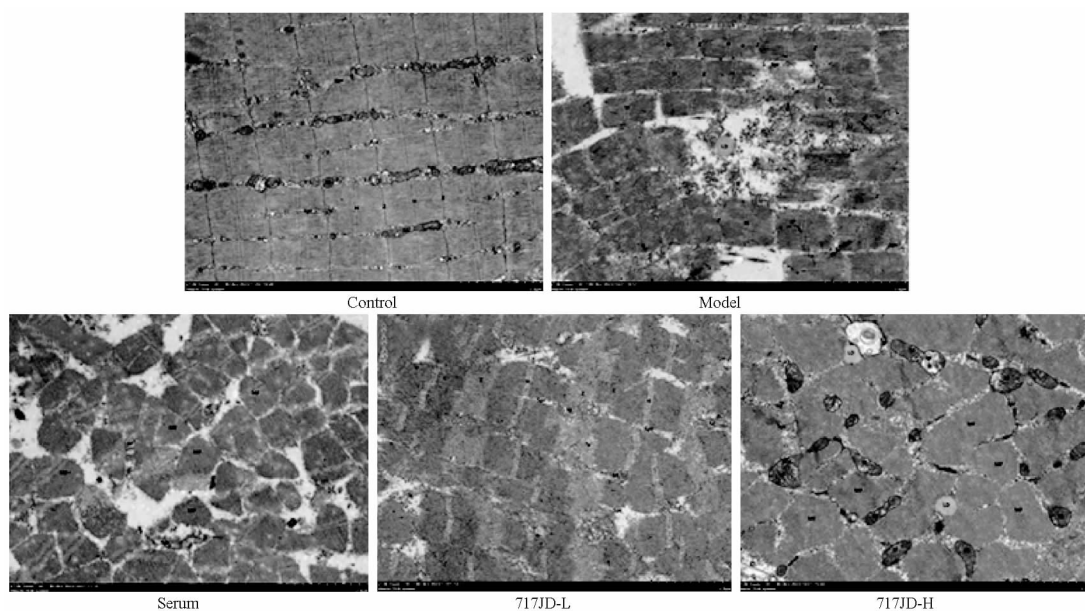


图 3 大鼠腓肠肌透射电镜观察超微结构变化($\times 7\ 000$)

Fig. 3 Ultrastructural changes of gastrocnemius of rats by TEM($\times 7\ 000$)

3.3 各组大鼠腓肠肌细胞凋亡情况

TUNEL 检测结果显示,model 组分布有大量凋亡细胞(棕黄色),其凋亡细胞数目明显高于 control 组;各给药组均可见少量凋亡细胞,但 717JD-H 组凋亡细胞少于 serum 组与 717JD-L 组。提示 717 解毒合剂有效抑制蝮蛇咬伤大鼠腓肠肌细胞凋亡率,且呈剂量依赖关系,见图 4。

3.4 血清 cf-DNA 与 MPO 水平、及腓肠肌 MPO 水平的比较

与 control 组比较,除 717JD-H 组外($P > 0.05$),其余各组 cf-DNA 水平均显著升高(均有 $P < 0.01$);与 model 组比较,各给药组 cf-DNA 均有显著降低($P < 0.01$),且 717JD-H 组 cf-DNA 水平稍低于 serum 组(图 5A)。与 control 组比较,蛇伤模型组血清与腓肠肌 MPO 含量均显著升高(均有 $P < 0.01$);与 model 组比较,各给药组大鼠血清中 MPO 均有所降低

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 5B),但 serum 组腓肠肌 MPO 无显著差异($P > 0.05$),而 717JD-H 组腓肠肌 MPO 显著降低($P < 0.05$)(图 5C)。

3.5 腓肠肌 NE 水平比较

免疫组化结果显示,与 control 组比较,腓肠肌 NE 显著升高,serum 组与 717JD-L 组有统计学差异(均有 $P < 0.01$),而 717JD-H 组无显著差异($P > 0.05$);与 model 组比较,serum 组与 717JD-L 组差异无统计学意义(均有 $P > 0.05$),而 717JD-H 组腓肠肌组织 NE 表达呈显著下降($P < 0.01$),见图 6。

3.6 腓肠肌组织 CitH3 蛋白表达比较

免疫荧光结果显示,与 control 组比较,model 组 CitH3 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),与 Model 组比较,serum 组无显著差异($P > 0.05$);而 717JD-L、717JD-H 组 CitH3 蛋白表达均显著降低(均有 $P < 0.01$),见图 7。

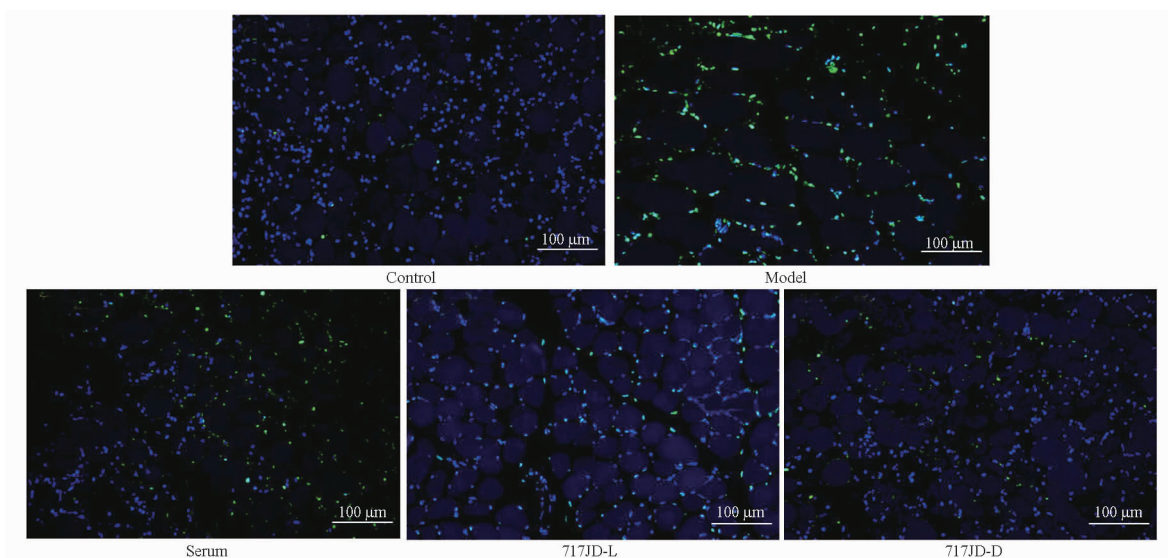
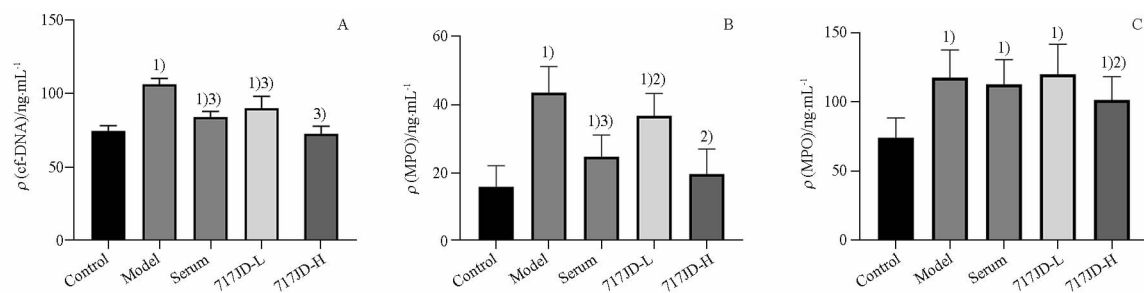


图4 大鼠腓肠肌 TUNEL 荧光细胞凋亡 ($\times 200$)

Fig4 Apoptosis of rat gastrocnemius by TUNEL assay ($\times 200$)

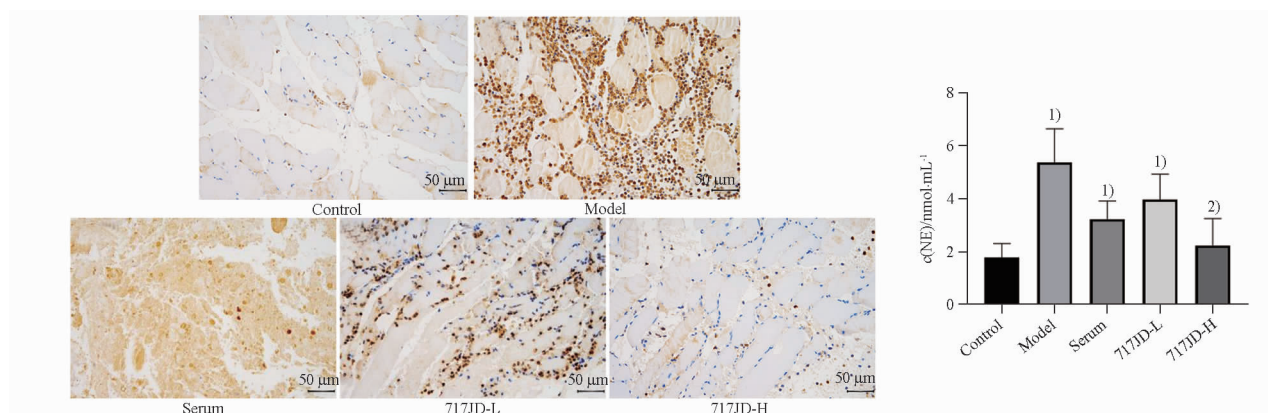


A - 血清 cf-DNA; B - 血清 MPO; C - 腓肠肌 MPO; 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

A - cf-DNA in serum; B - MPO in serum; C - MPO in gastrocnemius; ¹⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图5 大鼠血清游离 DNA(cf-DNA)水平、髓过氧化物酶(MPO)水平及腓肠肌 MPO 水平. $n = 8, \bar{x} \pm s$

Fig.5 cf-DNA and MPO levels in serum and MPO levels in gastrocnemius of rats. $n = 8, \bar{x} \pm s$



与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图6 大鼠腓肠肌组织中粒细胞弹性蛋白酶(NE)免疫组化染色结果 ($\times 400$). $n = 8, \bar{x} \pm s$

Fig.6 Results of NE IHC staining of gastrocnemius tissue of rats ($\times 400$). $n = 8, \bar{x} \pm s$

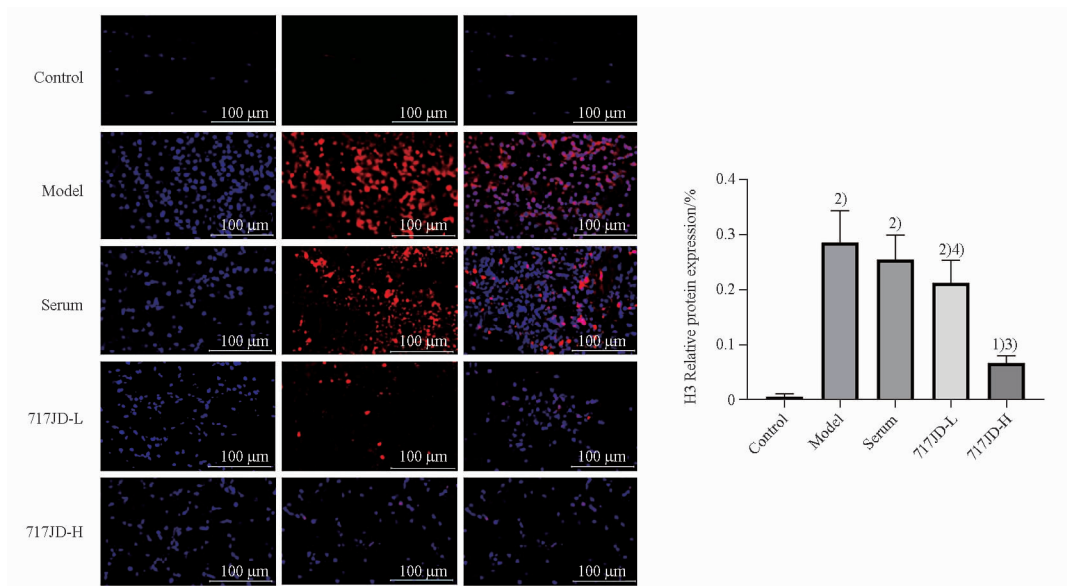
3.7 腓肠肌 CYR61 蛋白及其 mRNA 表达比较

与 control 组比较, 其余各组腓肠肌中 CYR61 蛋白及其 mRNA 过表达, 差异有统计学意义

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 model 组比较, 各给药组均抑制了腓肠肌 CYR61 蛋白及其 mRNA 表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$)。结果表明蝮蛇伤大鼠腓肠肌 CYR61 蛋白及其 mRNA 上调,717 解毒合剂能抑制蝮蛇

伤大鼠腓肠肌 CYR61 蛋白及其 mRNA 高表达。见图 8。

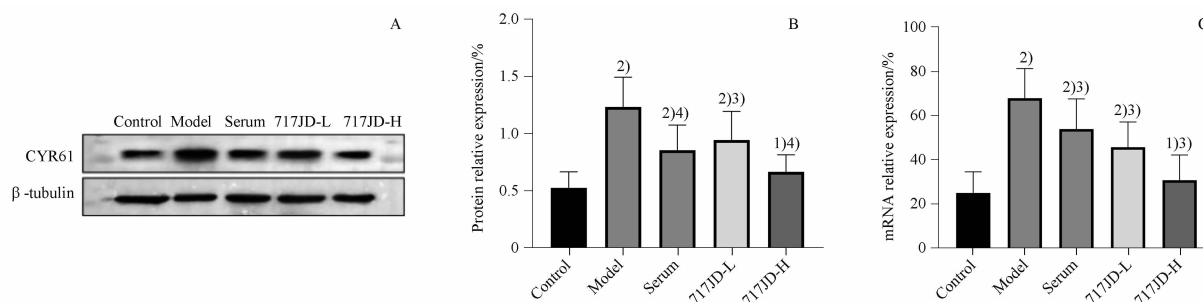


与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图 7 大鼠腓肠肌组织 NE 免疫荧光染色结果 ($\times 400$)。 $n = 8, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Results of NE IF staining of gastrocnemius tissue of rats ($\times 400$). $n = 8, \bar{x} \pm s$



A - 免疫印迹图; B - CYR61 蛋白相对表达量; C - CYR61 mRNA 相对表达量; 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

A - Western blot; B - the relative expression of CYR61 protein; C - the relative expression of CYR61 mRNA; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with model group.

图 8 大鼠腓肠肌 CYR61 蛋白及其 mRNA 表达。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Expression of CYR61 protein and its mRNA in gastrocnemius of rats. $n = 3, \bar{x} \pm s$

4 讨论

毒蛇咬伤是一个全球性的公共卫生问题。毒蛇咬伤局部病理效应包括出血、水肿、疼痛、肌坏死、皮肤坏死以及继发性感染等,是致残或导致永久性后遗症的主要原因,带来严重的病理生理、社会和心理后果。局部损伤效应产生的主要机制有炎症浸润,氧化应激,细胞外基质成分的降解及血运失衡等。蛇毒使局部组织产生显著的炎症反应和白细胞浸润,浸润细胞主要是多形核白细胞,多为中性粒细胞和富含巨噬细胞的浸润,使咬伤组织释放包括金属

蛋白酶、细胞因子、趋化因子及生长因子等多种介质^[13-14]。在受伤的局部组织中,一方面,高度活化的中性粒细胞将非致密染色质、颗粒蛋白释放到胞外;另一方面,过多募集的中性粒细胞必然产生一种区别于细胞凋亡和细胞坏死的新型细胞死亡方式,被称为 NETosis^[15]。NETosis 能介导非感染性组织损伤的关键分子,如蛋白激酶 C (PKC)、 Ca^{2+} 载体、活性氧 (ROS)、MPO、NE、肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 和 CitH3 等产生^[16-17]。这两方面的共同作用形成了 NETs。可见,蛇伤后局部组织产生的

NETs 是探讨其毒性发生、发展及其转归的重要内容,具有深入研究的价值。

一般地,NETs 被广泛认为具有抗感染作用并介导炎症消退,但新近的研究发现过量或未及时清除的 NETs 会导致炎症加重和组织损伤^[18-19]。因此,NETs 具有抗炎与促炎双重作用,是一把双刃剑。近年来,蛇毒引起的组织损伤产生 NETs 或 NETosis 已被探索。Swethakumar 等^[20]研究发现锯鳞蝥(*Echis carinatus*)毒液通过 PKC/细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)/c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号轴以 ROS 依赖性方式激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)氧化酶(NOX)和 PAD-4 来诱导 NETosis,眼镜蛇(*Naja naja*)毒液通过激活 PAD-4 酶来诱导 NETosis,并提出 NETosis 是蛇毒药效学中一个新探索的领域,研究其对蛇毒诱导的各种病理生理特性的影响具有重要意义。研究表明,蛇毒中如蛇毒丝氨酸蛋白酶(SVSPs)、蛇毒金属蛋白酶(SVMPs)、磷脂酶 A2(PLA2s)和蛇毒透明质酸酶(SVHYs),及 L-氨基酸氧化酶等酶类能直接或间接诱导 NETs 产生,从而引起局部炎症与组织坏死^[21-22]。可见,蛇伤后,咬伤组织中性粒细胞过度激活,诱导 NETosis 使过量的 NETs 形成是蛇毒引起局部组织损伤的主要原因。

Katkar 等^[23]研究发现锯鳞蝥毒液诱导中性粒细胞在咬伤部位积聚,并介导 NETs 形成,阻塞血管,从而促进组织破坏,而当小鼠同时注射毒液和降解 NETs 的脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)时,注射毒液部位中性粒细胞减少,且不会出现 NETs、毒液积聚和组织破坏,提出通过 DNase I 降解 NETs 是防止毒液诱导组织损伤。DNase I 通过清除由中性粒细胞聚集引起的 NETs 来促进伤口愈合^[24]。Rudresha 等^[22]发现四乙基秋兰姆二硫化物(TTD)能抑制锯鳞蝥中 SVMP 诱导的 NETosis,并降低 PAD-4、CitH3 和 MPO 表达水平,认为 TTD 具有治疗蛇毒介导的组织坏死的潜力。植物来源的 DNase 可以通过调控 NETs 有效治疗毒液诱导的小鼠组织损伤^[25]。鉴于 NETs 的双重效应,重塑 NETs 的形成与降解的平衡是有效治疗蛇伤局部效应的重要方向。

本研究结果显示,蝮蛇咬伤能引起显著的炎症浸润与出血反应,胶原纤维化程度升高;血清 cf-DNA,及 MPO 含量显著上升,腓肠肌 NE、MPO 及 CitH3 含量均有升高。其中,MPO 是中性粒细胞功能与活化的重要标志物^[26]。即蝮蛇毒能显著引发多种 NETs 关键标志物的高表达,提示蝮蛇咬伤后,

大鼠局部损伤组织 NETs 迅速形成,过度激活的 NETs 是蝮蛇毒介导组织进一步病理损伤的重要原因。中药复方 717 解毒合剂各给药组均能显著改善大鼠局部炎症反应及出血症状,降低胶原纤维化程度,有效抑制蝮蛇咬伤大鼠腓肠肌细胞凋亡率,降低血清 cf-DNA、MPO 含量,717JD-H 组抑制了腓肠肌 NE、MPO 的表达,717 解毒合剂各给药组均能降低腓肠肌 CitH3 的表达。这些结果提示,717 解毒合剂能显著抑制蝮蛇咬伤大鼠血清及腓肠肌 NETs 标志物高表达,因此,推测调控 NETs 表达水平是该复方治疗蝮蛇咬伤局部组织损伤效应的重要机制。

此外,本研究从 CYR61/CCN1 信号通路角度,初步探讨了蝮蛇咬伤引发局部组织 NETs 产生,以及 717 解毒合剂调控 NETs 水平的生物学机制。现有研究结果显示,NETs 的过度形成能诱导 NF- κ B、IL-6、NLRP3 炎症小体等炎症信号激活^[27-29]。而这些炎症信号能显著促进了新型炎症分子 CYR61/CCN1 表达^[30-32]。本研究结果显示,蝮蛇咬伤诱导 NETs 过度形成,而过量的 NETs 激活上述炎症信号从而介导 CYR61/CCN1 高表达。另一方面,CCN1 作为桥接分子,结合磷脂酰丝氨酸,促进了细胞凋亡与风化,并导致旺盛的中性粒细胞积累和延迟愈合^[33]。两方面的相互作用共同导致蛇伤局部组织损伤加重。而 717 解毒合剂各给药组能显著降低 NETs 水平,并抑制 CYR61/CCN1 高表达,结合现有研究,提示 717 解毒合剂调控 NETs 水平,进而抑制 CYR61/CCN1 信号可能是其改善蝮蛇咬伤症状的重要机制,在今后工作中课题组将以 NETs-CYR61/CCN1 为新靶点,进一步探讨蝮蛇咬伤局部组织损伤进展及其中医药防治详细机制。

REFERENCES

- [1] GÓMEZ-BETANCUR I, GOGINENI V, SALAZAR-OSPINA A, et al. Perspective on the therapeutics of anti-Snake venom[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3276. DOI: 10.3390/molecules24183276
- [2] ZHU M J, ZHONG J F, HE G G. Study on epidemiology and preventive measures of bites of *Aghkistrodon halys* in Jiangxi[J]. *Chin Ethnic and Folk Med*(中国民族民间医药), 2010, 19(3): 94-96.
- [3] SILVA L M G, ZAMUNER L F, DAVID A C, et al. Photobiomodulation therapy on bothrops snake venom-induced local pathological effects: A systematic review[J]. *Toxicon*, 2018, 152: 23-29.
- [4] GUTIÉRREZ J M, LEÓN G, ROJAS G, et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom[J]. *Toxicon*, 1998, 36(11): 1529-1538.
- [5] GUTIÉRREZ, JOSÉ MARÍA, RUCAVADO A, et al. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue

- damage induced by snake venoms[J]. *Toxicon*, 2018, 148:123-131.
- [6] ZULIANI J P, SOARES A M, GUTIÉRREZ J M. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming[J]. *Toxicon*. 2020, 187:188-197.
- [7] DONG D G, DENG Z P, YAN Z R, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense in detoxification systems of snake venom-induced toxicity[J]. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2020, 26:e20200053. DOI:10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0053
- [8] DONG D G, SONG M, CHEN J, *et al.* Study of the protection effect and mechanism of 717 Jiedu decoction on the local tissue damage caused by *Aghkistrodon halys* venom [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2021, 28(2):203-208.
- [9] ZHU Y, HUANG Y, JI Q, *et al.* Interplay between extracellular matrix and neutrophils in diseases[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021:8243378. DOI:10.1155/2021/8243378
- [10] KIM K H, WON J H, CHENG N, *et al.* The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair[J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(1):273-279.
- [11] DU H, ZHOU Y, SUO Y, *et al.* CCN1 accelerates re-epithelialization by promoting keratinocyte migration and proliferation during cutaneous wound healing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(4):966-972.
- [12] SHOME D, VON WOEDTKE T, RIEDEL K, *et al.* The HIPPO transducer YAP and its targets CTGF and Cyr61 drive a paracrine signalling in cold atmospheric plasma-mediated wound healing [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:4910280. DOI:10.1155/2020/4910280
- [13] GUTIÉRREZ JM, ESCALANTE T, HERNÁNDEZ R, *et al.* Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(5):182. DOI:10.3390/toxins10050182
- [14] OKAFOR AI, ONYIKE E. Inhibition of key enzymes linked to snake venom induced local tissue damage by kolaviron [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020, 32(6):1121-1130.
- [15] YOUSEFI S, STOJKOV D, GERMIC N, *et al.* Untangling “NETosis” from NETs[J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(2):221-227.
- [16] KENNY E F, HERZIG A, KRÜGER R, *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways[J]. *Elife*, 2017; 6:e24437. DOI:10.7554/eLife.24437
- [17] THIAM H R, WONG S L, WAGNER D D, *et al.* Cellular mechanisms of NETosis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36:191-218.
- [18] YU W H, CHEN L, LI T F, *et al.* Research progress of neutrophil extracellular traps induced tissue and organ damage [J]. *Chin J Gen Surg*(中国普通外科杂志), 2021, 30(12):1485-1494.
- [19] TAN C, AZIZ M, WANG P. The vitals of NETs[J]. *J Leukoc Biol*, 2021; 110(4):797-808.
- [20] SWETHAKUMAR B, NAVEENKUMAR S K, GIRISH K S, *et al.* The action of *Echis carinatus* and *Naja naja* venoms on human neutrophils; an emphasis on NETosis[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864(6):129561. DOI:10.1016/j.bbagen.2020.129561
- [21] EL-BENNA J, HURTADO-NEDELEC M, GOUGEROT-POCIDALO M A, *et al.* Effects of venoms on neutrophil respiratory burst; a major inflammatory function[J]. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2021, 27:e20200179. DOI:10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0179
- [22] RUDRESHA G V, URS A P, MANJUPRASANNA V N, *et al.* *Echis carinatus* snake venom metalloprotease-induced toxicities in mice; Therapeutic intervention by a repurposed drug, Tetraethyl thiuram disulfide (Disulfiram) [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(2):e0008596. DOI:10.1371/journal.pntd.0008596
- [23] KATKAR G D, SUNDARAM M S, NAVEENKUMAR S K, *et al.* NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11361. DOI:10.1038/ncomms11361
- [24] WANG Y, LIU F, CHEN L, *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) promote non-small cell lung cancer metastasis by suppressing lncRNA MIR503HG to activate the NF- κ B/NLRP3 inflammasome Pathway[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:867516. DOI:10.3389/fimmu.2022.867516
- [25] RUDRESHA G V, URS A P, MANJUPRASANNA V N, *et al.* Plant DNases are potent therapeutic agents against *Echis carinatus* venom-induced tissue necrosis in mice[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5):8319-8332.
- [26] CHEN H E, JIN X S, SONG D, *et al.* Effects of P38MAPK on Erythropoietin Postconditioning Attenuating Pneumocyte Apoptosis after Lung Ischemia/reperfusion Injury [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2014, 49(10):833-836.
- [27] ZHU B, ZHANG X, SUN S, *et al.* NF- κ B and neutrophil extracellular traps cooperate to promote breast cancer progression and metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 405(2):112707. DOI:10.1016/j.yexcr.2021.112707
- [28] AN Z, LI J, YU J, *et al.* Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages[J]. *Cell Cycle*. 2019, 18(21):2928-2938.
- [29] MÜNZER P, NEGRO R, FUKUI S, *et al.* NLRP3 inflammasome assembly in neutrophils is supported by PAD4 and promotes NETosis under sterile conditions[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:683803. DOI:10.3389/fimmu.2021.683803
- [30] ZHANG Y, GU F P, YAO S L, *et al.* Stretch-induced Expression of CYR61 Increases the Secretion of IL-8 in A549 Cells via the NF- κ B/ β Pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(4):672-678.
- [31] CHOI C, JEONG W, GHANG B, *et al.* Cyr61 synthesis is induced by interleukin-6 and promotes migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1):275. DOI:10.1186/s13075-020-02369-8
- [32] SU R L, QIAO Y, GUO R F, *et al.* Cyr61 overexpression induced by interleukin 8 via NF- κ B signaling pathway and its role in tumorigenesis of gastric carcinoma *in vitro*[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9):3197-3207.
- [33] JUN J I, KIM K H, LAU L F. The matricellular protein CCN1 mediates neutrophil efferocytosis in cutaneous wound healing[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7386. DOI:10.1038/ncomms8386.

(收稿日期:2023-04-26)