

核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 对脓毒症小鼠树突状细胞凋亡的调节作用

郑丽玉¹ 姚人骐² 董宁¹ 吴瑶¹ 姚咏明¹

¹中国人民解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853; ²中国人民解放军总医院第一医学中心普通外科, 北京 100853

通信作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com

【摘要】 目的 探讨核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 (NUFIP1) 对脓毒症小鼠树突状细胞 (DC) 凋亡的调节作用及机制。**方法** 构建 NUFIP1 基因敲低型 (Nufip1^{+/-}) C57BL/6J 小鼠, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 验证脾脏 DC 中 NUFIP1 的蛋白表达水平。将 48 只 SPF 级雄性野生型 (WT) 小鼠及 Nufip1^{+/-} 小鼠分为假手术 (Sham) 组 (18 只) 和脓毒症组 (30 只), 分别进行 3 次独立重复实验, 每次实验按照随机数字表法分组。脓毒症组采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 构建脓毒症模型; Sham 组仅开腹并分离盲肠, 不结扎。术后 24 h 取眼球血, 处死小鼠取心脏、肺脏、肝脏、肾脏组织及脾脏, 分离提取脾脏 DC。采用流式细胞术检测脾脏 DC 凋亡率; 采用 Western blotting 检测脾脏 DC 凋亡相关蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)、Bcl-2 及热休克蛋白 5 (HSPA5)、真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3 (EIF2AK3)、磷酸化 EIF2AK3 (p-EIF2AK3)、真核翻译起始因子 2A (EIF2A)、磷酸化 EIF2A (p-EIF2A)、转录激活因子 4 (ATF4)、DNA 损伤诱导转录因子 3 蛋白 (DDIT3) 的蛋白表达水平; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清白细胞介素 (IL-2、IL-4、IL-10)、转化生长因子- β (TGF- β) 及 γ -干扰素 (IFN- γ) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色后于光镜下观察心脏、肺脏、肝脏、肾脏损伤情况; 激光共聚焦显微镜下观察脾脏 DC 内质网 (ER) 形态。另取 WT 小鼠和 Nufip1^{+/-} 小鼠各 20 只, 分为 Sham 组和脓毒症组, 每组 10 只, 观察各组 CLP 术后 7 d 存活率。**结果** Western blotting 检测显示, Nufip1^{+/-} 小鼠脾脏 DC 中 NUFIP1 蛋白表达水平低于 WT 小鼠 (NUFIP1/ β -actin: 1.080 ± 0.233 比 2.178 ± 0.440 , $P < 0.05$), 提示 NUFIP1 基因缺陷小鼠构建成功。流式细胞术检测显示, Nufip1^{+/-} 脓毒症组 CLP 术后 24 h 脾脏 DC 细胞凋亡率较 WT 脓毒症组升高 [(43.41 $\pm$ 1.70)% 比 (30.43 $\pm$ 4.99)%, $P < 0.05$]。同时, Nufip1^{+/-} 脓毒症组脾脏 DC 中 caspase-3 蛋白表达水平较 WT 脓毒症组升高, 而 Bcl-2 蛋白表达水平较 WT 脓毒症组下降 (caspase-3/ β -actin: 1.23 ± 0.17 比 0.59 ± 0.14 , Bcl-2/ β -actin: 0.46 ± 0.13 比 0.72 ± 0.08 , 均 $P < 0.05$)。与 WT 脓毒症组比较, Nufip1^{+/-} 脓毒症组血清 IL-2 和 IFN- γ 水平降低 [IL-2 (ng/L): 8.54 ± 0.27 比 209.70 ± 1.56 , IFN- γ (ng/L): 391.60 ± 9.24 比 512.70 ± 31.50 , 均 $P < 0.05$], 而血清 IL-4、IL-10 和 TGF- β 水平升高 [IL-4 (ng/L): 73.19 ± 2.38 比 28.52 ± 0.98 , IL-10 (ng/L): 359.20 ± 2.02 比 267.60 ± 5.05 , TGF- β (ng/L): 826.20 ± 26.73 比 497.30 ± 3.33 , 均 $P < 0.05$], IFN- γ /IL-4 比值下降 (7.98 ± 0.46 比 16.59 ± 0.40 , $P < 0.05$), 提示脓毒症时 Nufip1^{+/-} 小鼠外周免疫抑制状态较 WT 小鼠进一步恶化。HE 染色显示, Nufip1^{+/-} 脓毒症组心脏、肺脏、肝脏及肾脏等组织损伤程度均较 WT 脓毒症组明显加重, 而 7 d 存活率较 WT 脓毒症组降低 [20% (2/10) 比 50% (5/10), $P < 0.05$]。与 WT 脓毒症组比较, Nufip1^{+/-} 脓毒症组 CLP 术后脾脏 DC 中 HSPA5、p-EIF2AK3/EIF2AK3 比值、p-EIF2A/EIF2A 比值、ATF4 及 DDIT3 蛋白表达水平均上调 [HSPA5/ β -actin: 0.93 ± 0.38 比 0.34 ± 0.02 , p-EIF2AK3/EIF2AK3 比值: 1.67 ± 0.28 比 0.59 ± 0.05 , p-EIF2A/EIF2A 比值: 0.90 ± 0.09 比 0.61 ± 0.08 , ATF4/ β -actin: 1.71 ± 0.77 比 1.60 ± 0.48 , DDIT3/ β -actin: 1.18 ± 0.12 比 0.56 ± 0.34 , 均 $P < 0.05$]。此外, 激光共聚焦显微镜下显示, Nufip1^{+/-} 脓毒症组脾脏 DC 的 ER 形态改变程度较 WT 脓毒症组更加明显, 呈现不规则扭曲、膨胀及碎裂。**结论** NUFIP1 基因缺陷可诱发脓毒症早期脾脏 DC 大量凋亡, 同时脓毒症动物外周免疫功能抑制加剧、多器官损害程度及存活率进一步恶化。

【关键词】 核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1; 脓毒症; 树突状细胞; 细胞凋亡; 内质网应激

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (82130062); 国家自然科学基金青年项目 (82402536)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251022-00521

Effect and regulatory mechanism of nuclear fragility X mental retardation interaction protein 1 on apoptosis of dendritic cells in sepsis

Zheng Liyu¹, Yao Renqi², Dong Ning¹, Wu Yao¹, Yao Yongming¹

¹Department of Medical Innovation Research, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of General Surgery, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Yao Yongming, Email: c_ff@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect and mechanism of nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1 (NUFIP1) on the apoptosis of dendritic cells (DCs) in septic mice. **Methods** Nufip1^{+/-} C57BL/6J mice were generated, and Western blotting was performed to verify the protein expression level of NUFIP1 in splenic

DCs. A total of 48 SPF male wild-type (WT) mice and Nufip1^{+/-} mice were divided into the sham group (18 mice) and the sepsis group (30 mice). Three independent replicate experiments were conducted, and mice were grouped using a random number table in each trial. The cecal ligation and puncture (CLP) procedure was performed to establish the sepsis model in the sepsis group; mice in the Sham group only underwent laparotomy and cecal separation without ligation. Twenty-four hours after operation, orbital blood was collected. The mice were then sacrificed, and heart, lung, liver, kidney tissues as well as spleens were harvested for isolation and extraction of splenic DCs. Flow cytometry was applied to detect the apoptosis rate of splenic DCs. Western blotting was used to determine the protein expression levels of apoptosis-related proteins including caspase-3, Bcl-2, heat shock protein 5 (HSPA5), eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 (EIF2AK3), phosphorylated EIF2AK3 (p-EIF2AK3), eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A), phosphorylated EIF2A (p-EIF2A), activating transcription factor 4 (ATF4) and DNA damage-inducible transcript 3 protein (DDIT3) in splenic DCs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the serum levels of interleukins (IL-2, IL-4, IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β) and interferon- γ (IFN- γ). Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the injury of heart, lung, liver and kidney under light microscope. The endoplasmic reticulum (ER) morphology of splenic DCs was observed under a laser confocal microscope. An additional 20 WT mice and 20 Nufip1^{+/-} mice were respectively assigned to the sham group and sepsis group, with 10 animals in each subgroup. The 7-day survival rate after CLP was observed in all groups. **Results** Western blotting results showed that the protein expression level of NUFIP1 in splenic DCs of Nufip1^{+/-} mice was lower than that of WT mice (NUFIP1/ β -actin: 1.080 ± 0.233 vs. 2.178 ± 0.440 , $P < 0.05$), indicating the successful construction of NUFIP1 gene-deficient mice. Flow cytometry results revealed that the apoptosis rate of splenic DCs at 24 h after CLP in the Nufip1^{+/-} sepsis group was higher than that in the WT sepsis group [$(43.41 \pm 1.70)\%$ vs. $(30.43 \pm 4.99)\%$, $P < 0.05$]. Meanwhile, compared with the WT sepsis group, the protein expression level of caspase-3 in splenic DCs was increased, while the protein expression level of Bcl-2 was decreased in the Nufip1^{+/-} sepsis group (caspase-3/ β -actin: 1.23 ± 0.17 vs. 0.59 ± 0.14 , Bcl-2/ β -actin: 0.46 ± 0.13 vs. 0.72 ± 0.08 , all $P < 0.05$). Compared with the WT sepsis group, the serum levels of IL-2 and IFN- γ in the Nufip1^{+/-} sepsis group were decreased [IL-2 (ng/L): 8.54 ± 0.27 vs. 209.70 ± 1.56 ; IFN- γ (ng/L): 391.60 ± 9.24 vs. 512.70 ± 31.50 , all $P < 0.05$], whereas the serum levels of IL-4, IL-10 and TGF- β were increased [IL-4 (ng/L): 73.19 ± 2.38 vs. 28.52 ± 0.98 ; IL-10 (ng/L): 359.20 ± 2.02 vs. 267.60 ± 5.05 ; TGF- β (ng/L): 826.20 ± 26.73 vs. 497.30 ± 3.33 , all $P < 0.05$], and the IFN- γ /IL-4 ratio was decreased (7.98 ± 0.46 vs. 16.59 ± 0.40 , $P < 0.05$). These findings suggested that peripheral immunosuppression was further aggravated in Nufip1^{+/-} mice during sepsis relative to WT mice. HE staining demonstrated that the injury of heart, lung, liver, kidney and other tissues in the Nufip1^{+/-} sepsis group was markedly severer than that in the WT sepsis group, and the 7-day survival rate was lower in Nufip1^{+/-} mice [20% (2/10) vs. 50% (5/10), $P < 0.05$]. Compared with the WT sepsis group, the protein expression levels of HSPA5, the ratio of p-EIF2AK3 to EIF2AK3, the ratio of p-EIF2A to EIF2A, ATF4 and DDIT3 in splenic DCs after CLP were all up-regulated in the Nufip1^{+/-} sepsis group (HSPA5/ β -actin: 0.93 ± 0.38 vs. 0.34 ± 0.02 , p-EIF2AK3/EIF2AK3 ratio: 1.67 ± 0.28 vs. 0.59 ± 0.05 , p-EIF2A/EIF2A ratio: 0.90 ± 0.09 vs. 0.61 ± 0.08 , ATF4/ β -actin: 1.71 ± 0.77 vs. 1.60 ± 0.48 , DDIT3/ β -actin: 1.18 ± 0.12 vs. 0.56 ± 0.34 , all $P < 0.05$). Laser confocal microscopy showed that the morphological changes of ER in splenic DCs of the Nufip1^{+/-} sepsis group were more obvious than those in the WT sepsis group, presenting irregular distortion, swelling and fragmentation. **Conclusions** NUFIP1 gene deficiency induces extensive apoptosis of splenic DCs in the early stage of sepsis, further aggravate peripheral immunosuppression, exacerbate multiple organ damage and worsen survival outcomes in septic animals.

【Key words】 Nuclear fragility X mental retardation interaction protein 1; Sepsis; Dendritic cell; Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress

Fund program: Key Project of National Natural Science Foundation of China (82241062); Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (82402536)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251022-00521

脓毒症是由于机体对于感染反应失调引起的致命性器官功能障碍,因此维持机体免疫反应平衡对脓毒症患者生存及预后具有重要意义^[1]。脓毒症状态下固有免疫及适应性免疫均呈现异常改变,在很大程度上促进了机体免疫抑制进一步发展,从而导致院内感染、慢性危重疾病甚至长期死亡的风险增加^[2-3]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内专职抗原提呈细胞,系连接固有免疫与适应性免疫的重要桥梁,能影响T细胞增殖分化状态,进而调节免疫平衡状态,在机体免疫应答中发挥重要作用^[3]。核脆性X精神发育迟滞相互作用蛋白1(nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1, NUFIP1)最

初被认定为一种核蛋白,在突触中与脆性X精神发育迟滞蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)相互作用,穿梭于细胞核与细胞质之间^[4]。越来越多的研究揭示了NUFIP1的不同细胞功能,例如,在饥饿时NUFIP1可易位至细胞质中核糖体、自噬小体及溶酶体,介导核糖体自噬^[5]。本课题组前期研究表明,NUFIP1介导的核糖体自噬可通过抑制过度内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应及调控未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)信号通路转导,从而缓解T细胞凋亡^[6]。在前期树突状细胞系DC2.4的研究中也发现,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后DC2.4中

NUFIP1 介导核糖体自噬明显活化,且对 DC2.4 细胞凋亡具有显著保护效应^[7]。然而,虽然 DC2.4 细胞系保留了一些 DC 的特性,但其功能可能与原代细胞有所不同,尤其在复杂的免疫反应中,难以充分反映体内实际状态。本研究将验证对象转向更具生理相关性的原代脾脏 DC,以提升结论的真实性与外推价值;通过调控 NUFIP1 基因表达,探讨 DC 内在应激/自噬稳态与 DC 凋亡及机体外周免疫抑制之间的关系,拓展脓毒症免疫抑制机制的新视角;评估 NUFIP1 是否有望作为逆转脓毒症免疫抑制、改善免疫平衡与预后的新靶点,并为脓毒症患者的免疫重建与个体化干预提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF 级雄性野生型 (wild type, WT) C57BL/6J 小鼠,周龄 6~8 周,体质量 20~25 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司〔动物许可证号:SCXK(京)2024-0003〕。委托上海南方模式生物科技有限公司定制并提供 NUFIP1 基因缺陷型 C57BL/6J 小鼠,因其纯合子 (Nufip1^{-/-}) 小鼠胚胎致死率高且无法正常繁殖,故构建 NUFIP1 基因敲低型 (Nufip1^{+/-}) 小鼠〔动物许可证号:SCXK(沪)2017-0010〕。由公司代培育至 6~8 周龄,体质量 20~25 g。本研究经中国人民解放军总医院医学伦理委员会批准(审准号:2024-X20-40)。

1.2 主要材料及试剂: 兔抗小鼠 NUFIP1 多抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;鼠抗 DNA 损伤诱导转录因子 3 蛋白 (DNA damage-inducible transcript 3 protein, DDIT3) 单抗购自英国 Abcam 公司;兔抗小鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 抗体、兔抗小鼠 Bcl-2 抗体、兔抗小鼠热休克蛋白 5 (heat shock protein 5, HSPA5) 单抗、兔抗小鼠磷酸化真核翻译起始因子 2A (phospho-eukaryotic translation initiation factor 2A, p-EIF2A) 单抗、兔抗小鼠 EIF2A 单抗、兔抗小鼠转录激活因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 单抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 探针购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Annexin V-藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔二抗及羊抗鼠二抗、鼠抗 β -肌动蛋白 (β -actin)、BCA 蛋白定量试剂盒、超敏增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒均购自北京华兴博创基因技术有限公司。

1.3 实验分组与脓毒症模型构建: 将小鼠置于 SPF 级动物实验室屏障环境下适应性饲养 3 d (温度 20~26 °C, 日温差 ≤ 4 °C, 相对湿度 40%~70%), 实验前禁食不禁水 12 h。将 48 只 WT 小鼠及 Nufip1^{+/-} 小鼠分为假手术 (Sham) 组 (18 只) 和脓毒症组 (30 只), 分别进行 3 次独立重复实验, 每次实验按照随机数字表法分组。脓毒症组采用盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 构建脓毒症模型: 采用 0.3% 戊巴比妥钠溶液 (10 mL/kg) 腹腔注射麻醉小鼠, 麻醉后将小鼠仰卧位固定于手术操作板上, 于剑突下 1 cm 处用眼科剪沿腹白线作纵向切口, 分离盲肠并在距离盲肠末端约 1 cm 处进行结扎; 随后用 22 G 穿刺针头于盲肠末端、避开血管处穿刺 1 次, 挤压盲肠使粪便溢出, 然后将盲肠还纳原位, 缝合腹部切口; 最后在小鼠颈后皮下注射 0.9% 生理盐水 1 mL。Sham 组仅进行麻醉、开腹、分离暴露盲肠操作, 随后将盲肠还纳原位, 缝合腹部切口。另取 WT 小鼠和 Nufip1^{+/-} 小鼠各 20 只, 分为 Sham 组和脓毒症组, 每组 10 只, 用于观察 CLP 术后 7 d 存活率。

1.4 小鼠脾脏 DC 分离方法

1.4.1 MiniMACS 磁珠法分离小鼠脾脏 CD11c⁺ DC: 处死小鼠后取脾脏至磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 去除脾脏筋膜并撕碎后移至 75 μ m 细胞滤网上进行研磨, 收集细胞悬液。应用小鼠器官淋巴细胞分离液分离获取外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 并进行细胞计数。按每 1×10^7 细胞加入 10 μ L 抗小鼠 CD11c⁺ 免疫磁珠及 40 μ L PBS, 混匀后 4 °C 避光孵育 15 min。将分选柱置于 MiniMACS 磁场中, 先用 PBS 润洗柱子 1 遍, 再向磁场中柱子内加入细胞悬液, 待细胞快滴完时加入 PBS 洗涤 3 遍; 将磁场中柱子取下置于 15 mL 离心管中, 向柱子内加入 PBS, 迅速用柱子活塞将柱子中细胞推出, 即为实验所需 DC, 离心计数。

1.4.2 EasySep CD11c Pos 免疫磁珠细胞分选技术分离小鼠脾脏 CD11c⁺ DC: 分离提取脾脏细胞悬液方法同上。按每 1×10^8 细胞加入 50 μ L 大鼠血清混匀, 室温封闭 5 min; 同时将 25 μ L A 液与 25 μ L B 液混匀静置。将 50 μ L AB 混合液加入细胞悬液, 混匀后室温静置 5 min。震荡 RapidSpheres 30 s, 加入 60 μ L RapidSpheres 至细胞悬液, 室温孵育 5 min。用含有 2% 胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) 的 PBS 将细胞重悬至 10 mL 并转移至 15 mL 圆底离心管

中,放入 EasySep 磁场中,静置 3 min;将 EasySep 分选仪倒扣弃上清,重复 3 次。管壁上黏附的 CD11c⁺ 细胞即为 DC,离心计数。

1.5 流式细胞术鉴定 DC 纯度:将方法 1.3 中提取的 DC 按 3×10^5 细胞数置于流式管中,用 PBS 洗涤 1 遍,离心后用 100 μ L PBS 重悬细胞沉淀,随后加入 1 μ L 表面标记分子 PE-CD11c 抗体标记 DC,室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 遍,1% 多聚甲醛固定,采用流式细胞分析术鉴定脾脏 DC 中 CD11c⁺ 比值。

1.6 流式细胞术检测 DC 凋亡率:收集 3×10^5 DC/管, PBS 洗涤样本 1 次,结合缓冲液清洗 1 次,各管留 100 μ L 结合缓冲液重悬细胞,空白对照组设置 1 管阴性对照、1 管单染 7-氨基放线菌素 D (7-Aminoactinomycin D, 7-AAD)、1 管单染 PE-Annexin V;各实验组按 2.5 μ L/管加入 PE-Annexin V,按 5 μ L/管加入 7-AAD,室温避光孵育 15 min,结合缓冲液清洗 1 次,各管加入 200 μ L 结合缓冲液重悬细胞,1 h 内上机检测各组细胞凋亡率。

1.7 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 DC 中蛋白表达水平:收集各组细胞并进行裂解,采用 BCA 法检测蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 使蛋白样本分离,采用湿转法转膜使蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上,然后置于快速封闭液室温封闭 10 min,一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜、室温条件下孵育二抗 (1:5 000) 1 h,使用超敏 ECL 试剂盒进行显影,使用 Image Quant LAS 4000 凝胶成像系统进行观察和成像,使用 Image J 软件分析各组目的蛋白条带灰度值,以 β -actin 为内参,以目的蛋白与 β -actin 的比值反映目的蛋白表达量,检测 NUFIP1 表达量、细胞凋亡水平及 ERS 活化水平。

1.8 脓毒症小鼠整体状态评估:① 于 CLP 术后 24 h

收集小鼠眼球血,按照酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书操作,检测血清中白细胞介素 (interleukins, IL-2、IL-4、IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 及 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 含量,以评估外周免疫抑制状态。② 解剖小鼠心脏、肺脏、肝脏和肾脏,用 4% 多聚甲醛固定,随后用石蜡包埋。取厚度为 4~5 μ m 的组织切片进行脱蜡处理,并用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色进行组织学评价。③ 观察小鼠 CLP 术后 7 d 存活率。

1.9 激光共聚焦显微镜观察 ER 形态:将不同组细胞按 2×10^6 /管收集于流式细胞管中, PBS 清洗 1 次,4% 多聚甲醛固定 1 h 以上, PBS 清洗 3 次,0.3% Tritonx-100 破膜 10 min; PBS 清洗 3 次,将 ER 探针 (1:1 000) 加入 1% BSA 中室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 次;将细胞重悬于 60 μ L PBS 中,取 35 μ L 细胞重悬液滴加于防脱载玻片上,再滴加 5 μ L 含封片剂的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI),盖上防脱盖玻片。在倒置激光扫描共聚焦显微镜下观察 ER 形态改变。

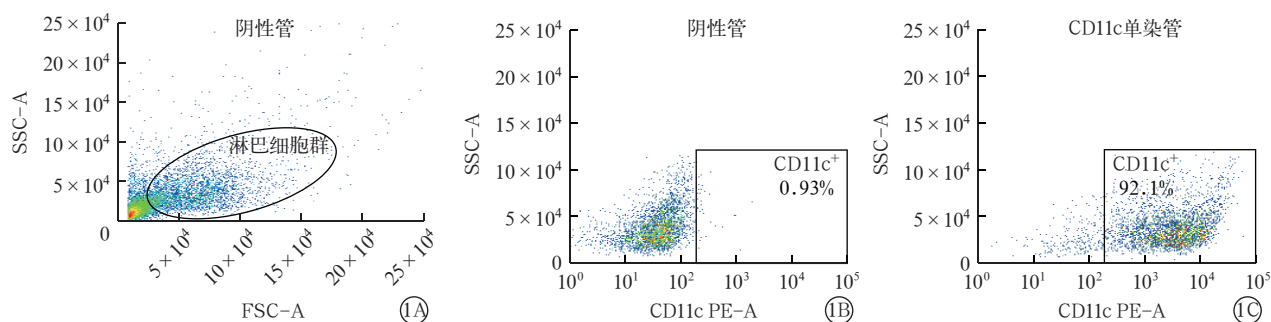
1.10 统计学方法:使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 LSD- t 检验,多组间均数比较应用双因素方差分析 (two-way ANOVA)。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线分析各组小鼠 CLP 术后 7 d 存活率。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 调节脾脏 DC 中 NUFIP1 基因表达对脓毒症小鼠 DC 凋亡的影响

2.1.1 流式细胞术鉴定脾脏 DC 纯度 (图 1):脾脏 DC 中 CD11c⁺ 细胞比值为 92.11%。

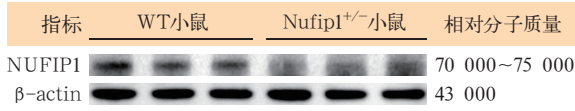
2.1.2 Nufip1^{+/-} 小鼠脾脏 DC 中 NUFIP1 蛋白表达水平验证 (图 2):Nufip1^{+/-} 小鼠脾脏 DC 中 NUFIP1



注: DC 为树突状细胞, SSC 为侧向散射光, FSC 为前向散射光, PE 为藻红蛋白

图 1 磁珠分选法分离小鼠脾脏 DC 后流式细胞术鉴定 CD11c⁺ 细胞比例

蛋白表达水平较 WT 小鼠降低 (NUFIP1/ β -actin: 1.080 ± 0.233 比 2.178 ± 0.440 , $P=0.019$)。



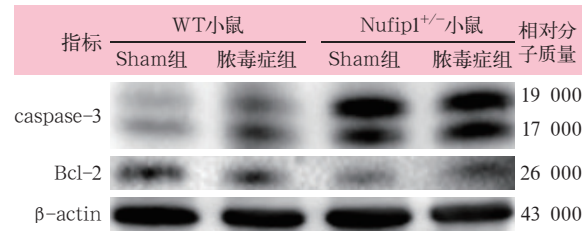
注: Nufip1^{+/-} 为核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 (NUFIP1) 基因敲低型, DC 为树突状细胞, WT 为野生型, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 2 Nufip1^{+/-} 小鼠脾脏 DC 中 NUFIP1 蛋白表达量验证

2.1.3 NUFIP1 基因敲低对脓毒症小鼠脾脏 DC 凋亡的影响: 流式细胞术检测显示, Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠 CLP 术后 24 h 脾脏 DC 细胞凋亡率较 WT 脓毒症组升高 ($P<0.05$; 图 3; 表 1)。同时, Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠脾脏 DC 中凋亡相关蛋白 caspase-3 表达水平较 WT 脓毒症组升高, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平较 WT 脓毒症组降低 (均 $P<0.05$; 图 4; 表 1)。

2.2 NUFIP1 基因敲低对脓毒症小鼠整体状态的影响: 与 WT 脓毒症组比较, Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠血清 IL-2、IFN- γ 水平降低, 而抗炎细胞因子 IL-4、IL-10、TGF- β 水平升高, IFN- γ /IL-4 比值下降 ($P<0.05$; 表 2); 提示 Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠外周免疫抑制状态较 WT 脓毒症组进一步恶化。HE 染色显示, Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠心脏、肺脏、肝脏及肾脏组织损伤程度较 WT 脓毒症组明显加重 (图 5)。进

一步分析存活率显示, 两种品系 Sham 组小鼠均存活, 而 Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠 CLP 术后 7 d 存活率较 WT 脓毒症组降低 ($P<0.05$; 图 6)。



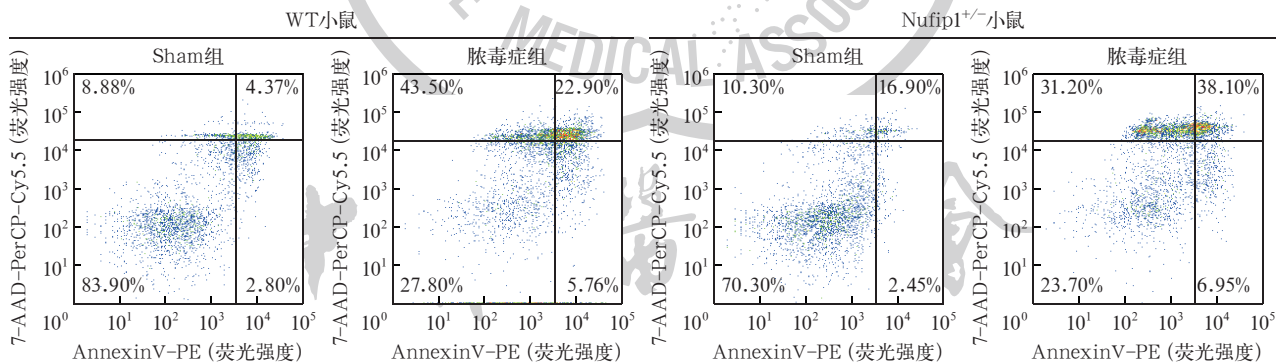
注: WT 为野生型, Sham 为假手术, Nufip1^{+/-} 为核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型, DC 为树突状细胞, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Bcl-2 为抗凋亡蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠脾脏 DC 中 caspase-3 和 Bcl-2 的蛋白表达

表 1 各组小鼠脾脏 DC 的细胞凋亡率及 caspase-3 和 Bcl-2 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	细胞凋亡率 (%)	caspase-3/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
WT Sham 组	9	20.24 ± 1.04	0.22 ± 0.03	0.83 ± 0.05
Nufip1 ^{+/-} Sham 组	9	7.58 ± 1.62	0.69 ± 0.02	0.47 ± 0.10
WT 脓毒症组	15	30.43 ± 4.99	0.59 ± 0.14	0.72 ± 0.08
Nufip1 ^{+/-} 脓毒症组	15	43.41 ± 1.70^a	1.23 ± 0.17^a	0.46 ± 0.13^a

注: WT 为野生型, Sham 为假手术, Nufip1^{+/-} 为核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Bcl-2 为抗凋亡蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白; ^a 与 WT 脓毒症组比较, $P<0.05$



注: WT 为野生型, Sham 为假手术, Nufip1^{+/-} 为核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型, DC 为树突状细胞, 7-AAD 为 7-氨基放线菌素 D, PerCP-Cy5.5 为 PerCP-Cy5.5 串联染料, PE 为藻红蛋白

图 3 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏 DC 细胞凋亡情况

表 2 各组小鼠术后 24 h 血清 IL-2、IL-4、IL-10、TGF- β 、IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-2 (ng/L)	IL-4 (ng/L)	IL-10 (ng/L)	TGF- β (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	IFN- γ /IL-4 比值
WT Sham 组	9	146.00 ± 2.84	43.34 ± 2.26	184.30 ± 5.97	577.50 ± 9.08	144.80 ± 1.62	6.56 ± 0.16
Nufip1 ^{+/-} Sham 组	9	8.41 ± 0.17	3.30 ± 0.24	249.40 ± 8.02	564.40 ± 3.54	481.60 ± 1.27	12.09 ± 0.96
WT 脓毒症组	15	209.70 ± 1.56	28.52 ± 0.98	267.60 ± 5.05	497.30 ± 3.33	512.70 ± 31.50	16.59 ± 0.40
Nufip1 ^{+/-} 脓毒症组	15	8.54 ± 0.27^a	73.19 ± 2.38^a	359.20 ± 2.02^a	826.20 ± 26.73^a	391.60 ± 9.24^a	7.98 ± 0.46^a
F 值		1 145.000	1 736.000	16.360	427.600	581.700	452.600
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: WT 为野生型, Sham 为假手术, Nufip1^{+/-} 为核脆性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型, IL 为白细胞介素, TGF- β 为转化生长因子- β , IFN- γ 为 γ -干扰素; ^a 与 WT 脓毒症组比较, $P<0.05$

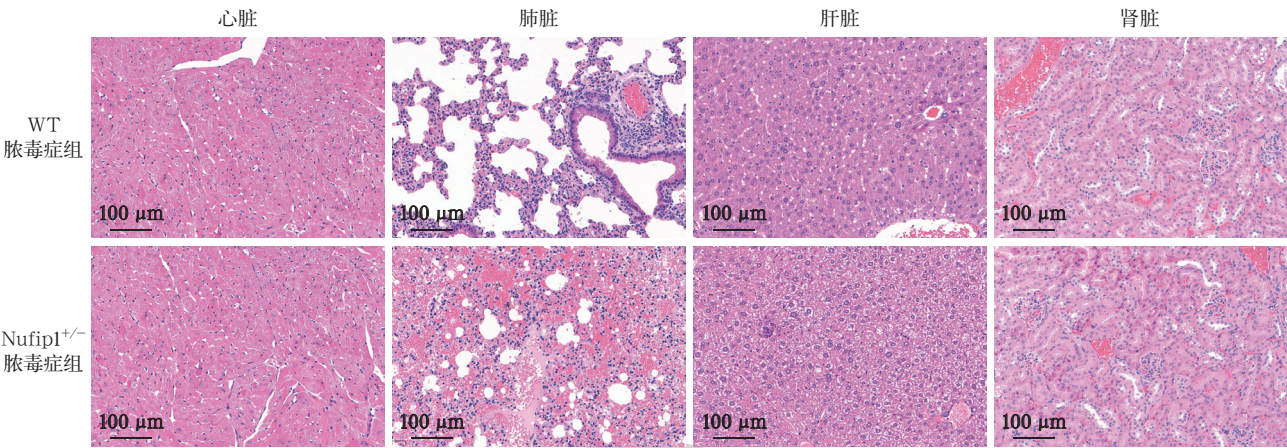
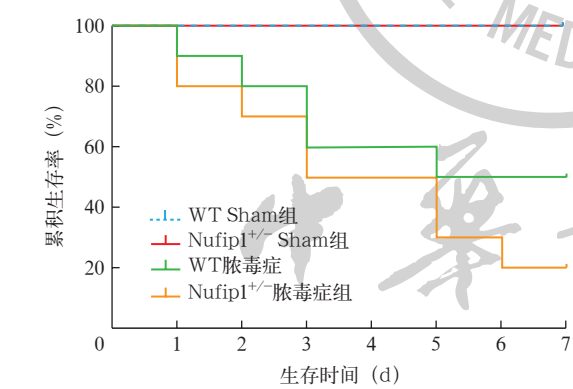


图 5 光镜下观察各组小鼠心脏、肺脏、肝脏和肾脏组织病理学改变 野生型(WT)脓毒症组心脏无显著病理改变;肺泡上皮细胞层次增多,形态及大小发生显著改变,排列紊乱,细胞肥大(体积及胞核均增大);肝组织内可见少量空泡,体积较小,肝组织轻度脂肪变性,组织间质内可见红细胞积聚;肾脏局部肾小管上皮可见少量空泡形成,呈轻度脂肪变性。核糖性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型(Nufip1^{+/-})脓毒症组心肌组织内可见少量空泡形成(将细胞核挤向一侧),呈轻度脂肪变性;肺泡腔内弥漫性出血、水肿伴炎性细胞浸润,组织结构模糊紊乱;肝细胞疏松水肿,伴局灶性坏死及炎性浸润;局部肾小管上皮可见少量空泡形成,呈轻度脂肪变性 苏木素-伊红(HE)染色 低倍放大

表 3 各组小鼠脾脏 DC 中 ERS 反应及 UPR 信号活化相关蛋白的蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	孔数(孔)	HSPA5/ β -actin	p-EIF2AK3/EIF2AK3 比值	p-EIF2A/EIF2A 比值	ATF4/ β -actin	DDIT3/ β -actin
WT Sham 组	3	0.16 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.13	1.33 $\pm$ 0.95	0.51 $\pm$ 0.14
Nufip1 ^{+/-} Sham 组	3	0.32 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.13	1.67 $\pm$ 0.90	0.40 $\pm$ 0.13
WT 脓毒症组	3	0.34 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.08	1.60 $\pm$ 0.48	0.56 $\pm$ 0.34
Nufip1 ^{+/-} 脓毒症组	3	0.93 $\pm$ 0.38 ^a	1.67 $\pm$ 0.28 ^a	0.90 $\pm$ 0.09 ^a	1.71 $\pm$ 0.77 ^a	1.18 $\pm$ 0.12 ^a
F 值		3.791	1.463	5.120	1.624	9.461
P 值		0.011	<0.001	0.022	0.020	0.012

注:WT为野生型,Sham为假手术,Nufip1^{+/-}为核糖性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型,DC为树突状细胞,ERS为内质网应激,UPR为未折叠蛋白反应,HSPA5为热休克蛋白 5, β -actin为 β -肌动蛋白,p-EIF2AK3为磷酸化真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3,EIF2AK3为真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3,p-EIF2A为磷酸化真核翻译起始因子 2A,EIF2A为真核翻译起始因子 2A,ATF4为转录激活因子 4,DDIT3为 DNA 损伤诱导转录因子 3 蛋白;^a与 WT 脓毒症组比较, $P < 0.05$

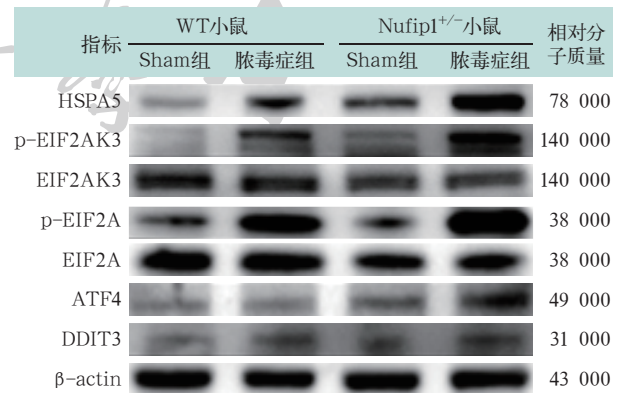


注:WT为野生型,Sham为假手术,Nufip1^{+/-}为核糖性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型,CLP 为盲肠结扎穿孔术

图 6 各组小鼠 CLP 术后 7 d 的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.3 NUFIP1 基因敲低对 ERS 反应及 UPR 信号活化的影响:与 WT 脓毒症组比较,Nufip1^{+/-} 脓毒症组小鼠脾脏 DC 中 HSPA5、磷酸化真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3(phospho-eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3, p-EIF2AK3)/EIF2AK3 比值、p-EIF2A/EIF2A 比值、HSPA5、ATF4 及 DDIT3 表达水平均上调($P < 0.05$; 图 7; 表 3)。激光共聚焦显

微镜下显示(图 8), Nufip1^{+/-} 脓毒症组脾脏 DC 的 ER 形态改变较 WT 脓毒症组更明显,ER 形态呈现不规则扭曲,ER 膨胀及碎裂程度更加明显。提示



注:WT为野生型,Sham为假手术,Nufip1^{+/-}为核糖性 X 精神发育迟滞相互作用蛋白 1 基因敲低型,DC为树突状细胞,ERS为内质网应激,UPR为未折叠蛋白反应,HSPA5为热休克蛋白 5,p-EIF2AK3为磷酸化真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3,EIF2AK3为真核生物翻译起始因子 2 α 激酶 3,p-EIF2A为磷酸化真核翻译起始因子 2A,EIF2A为真核翻译起始因子 2A,ATF4为转录激活因子 4,DDIT3为 DNA 损伤诱导转录因子 3 蛋白, β -actin为 β -肌动蛋白

图 7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠脾脏 DC 中 ERS 反应及 UPR 信号活化相关蛋白的蛋白表达

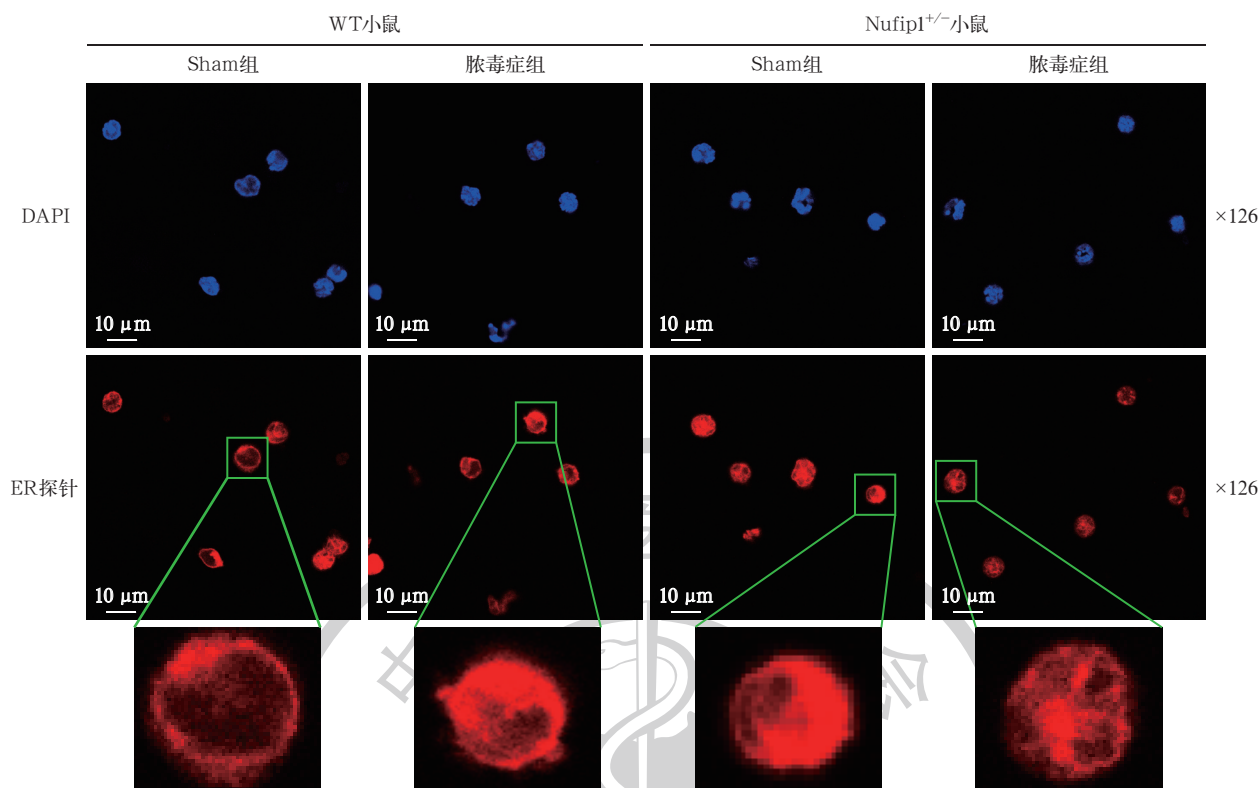


图8 激光共聚焦显微镜下观察各组小鼠脾脏树突状细胞(DC)的内质网(ER)形态改变。4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核呈蓝色,ER探针染内质网呈红色。高倍镜视野($\times 126$)显示ER呈核周聚集分布;局部放大4倍显示,野生型(WT)假手术(Sham)组ER排列规则、结构清晰;WT脓毒症组发生轻度肿胀与碎裂;核脆性X精神发育迟滞相互作用蛋白1基因敲低型($Nufip1^{+/-}$)Sham组ER排布尚规则,但可见明显肿胀; $Nufip1^{+/-}$ 脓毒症组ER结构受损最剧烈,表现为不规则扭曲、重度肿胀及明显碎裂

NUFIP1 基因缺陷可促进脓毒症时 ERS 反应及 UPR 信号通路活化。

3 讨论

脓毒症作为重症监护病房(intensive care unit, ICU)的“隐形杀手”,其复杂的发病过程和高病死率始终是危重病急救医学领域亟待攻克的难题^[8]。尽管集束化治疗降低了住院病死率,但存活患者出院后仍面临高死亡风险及远期的器官功能缺陷,凸显出现有治疗在免疫稳态调控上的不足^[9]。研究表明,脓毒症诱导的免疫抑制状态与 T 细胞、B 细胞及 DC 等凋亡增加密切相关^[10-11]。DC 作为目前已知体内功能最强的专职抗原提呈细胞,是连接固有与适应性免疫的桥梁^[3]。在严重感染发生发展中,DC 数量减少和功能障碍深刻参与了脓毒症免疫抑制及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的病理进程^[12]。针对性改善 DC 凋亡有助于减轻脓毒症小鼠免疫抑制状态及 MODS 程度,显著提高存活率^[13]。据此,剖析 DC 凋亡机制将为脓毒症精准免疫治疗提供新思路。

近年来,NUFIP1 作为细胞应激反应的“多面手”逐渐进入研究视野。该蛋白在核质穿梭中呈现

动态特性,其在神经发育、代谢调控等生理过程中扮演重要角色^[14-15]。有研究表明,NUFIP1 在细胞应对饥饿等应激条件时,能被诱导转移至细胞质,参与核糖体自噬的过程,这一过程涉及细胞内大分子(如核糖体和溶酶体)的清除和再利用,有助于细胞适应营养匮乏的环境^[5, 16-17]。在胰腺导管腺癌研究中观察到,肿瘤相关成纤维细胞利用 NUFIP1 依赖的核糖体自噬功能分泌核苷,以促进胰腺肿瘤细胞生长,而靶向间质中 NUFIP1 抑制核苷分泌则有效抑制肿瘤生长及进展^[18]。另一项研究证实,氨基酸缺乏通过降低 NUFIP1 蛋白水平影响 DNA 损伤反应,导致炎症性肠病动物肠组织中 DNA 损伤的积累,引发坏死性凋亡并加剧肠炎表型^[19]。既往研究显示,脓毒症早期 DC 及 T 细胞中 NUFIP1 介导的核糖体自噬显著激活,而 $Nufip1$ 缺失会导致细胞凋亡上调^[6-7]。本研究通过构建 NUFIP1 基因缺陷小鼠进一步证实,在脓毒症打击下, $Nufip1^{+/-}$ 小鼠脾脏 DC 呈现异常改变:NUFIP1 蛋白表达锐减,且细胞凋亡率较 WT 小鼠显著升高。这种细胞应答失调引发了严重的不良结局——外周免疫抑制恶化,MODS 损害加剧,术后 7 d 病死率明显增加。结果有

力印证了“DC 凋亡-免疫崩溃-器官衰竭”的恶性循环,而 NUFIP1 恰似该循环的“安全阀”。另有研究显示,人骨髓间充质干细胞来源的 NUFIP1 工程化外泌体具有调节新生大鼠神经细胞凋亡和减轻丙泊酚诱导神经损伤的潜力^[20]。由此可见,NUFIP1 参与调节自噬和细胞应答过程,在神经退行性疾病、感染性疾病及肿瘤等方面具有潜在临床应用价值,NUFIP1 可能成为治疗多种疾病的潜在靶点。

ER 是蛋白质折叠加工的重要场所,其功能受扰诱发的 ERS 与细胞凋亡高度相关。当 ERS 无法通过 UPR 机制缓解时,会启动促凋亡信号造成细胞死亡^[21]。本课题组曾证实,NUFIP1 对免疫细胞凋亡的保护效应与抑制过度活化的 ERS 及相关途径有关^[6]。本研究显示,NUFIP1^{+/-}脓毒症小鼠较 WT 脓毒症小鼠脾脏 DC 的 ERS 反应过度活化,EIF2AK3 磷酸化水平及 ATF4、DDIT3 蛋白表达显著上调;同时,ER 形态的不规则扭曲、膨胀及碎裂更加明显。这提示 NUFIP1 基因通过调控 ERS 反应及 EIF2AK3-ATF4-DDIT3 信号轴,维持 ER 稳态,进而缓解脾脏 DC 凋亡。

值得一提的是,靶向 NUFIP1 的临床转化潜力亟待加强。结合本研究发现的 DC 特异性保护效应,设计靶向递送 NUFIP1 的纳米载体或基因编辑疗法,可能成为突破现有免疫调节治疗瓶颈的新方向。例如,利用纳米技术递送信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 以增加 NUFIP1 表达,或通过基因编辑工具 CRISPRa 精细调控其关键功能位点,可有效干预自噬依赖性免疫通路。当然,NUFIP1 在全身广泛表达的特性犹如双刃剑,其在非免疫细胞中的生物学效应及长期干预的安全性,仍需通过条件性敲除模型深入阐明。建立脓毒症患者 DC 亚群的 NUFIP1 表达谱系也将增强该研究的临床相关性。

综上所述,NUFIP1 基因缺陷可引发脓毒症早期脾脏 DC 大量凋亡,加剧动物外周免疫抑制、多器官损害及恶化存活率。靶向维持 NUFIP1 表达有助于调节机体免疫反应,对防治脓毒症具有潜在应用价值。在脓毒症治疗从“抗感染”向“免疫重塑”转型的今天,这种以关键分子为枢纽、多机制联动的策略,或将成为破局重症感染免疫治疗困境的新希望。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 郑丽玉:实施研究、起草文章;姚人骐:酝酿和设计实验、支持性贡献;董宁:采集数据、统计分析;吴瑶:分析/解释数据,行政、技术或材料支持;姚咏明:对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费,指导

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Shock and Sepsis Society of Chinese Research Hospital Association, China Critical Care Immunotherapy Research Group, International Federation of the Shock Societies (IFSS). Expert consensus on the monitoring and treatment of sepsis-induced immunosuppression[J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 74. DOI: 10.1186/s40779-022-00430-y.
- [3] Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(2): 89-103. DOI: 10.1038/s41577-018-0088-1.
- [4] Bardoni B, Willemsen R, Weiler IJ, et al. NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneuroosomes[J]. Exp Cell Res, 2003, 289(1): 95-107. DOI: 10.1016/s0014-4827(03)00222-2.
- [5] Wyant GA, Abu-Remaileh M, Frenkel EM, et al. NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy[J]. Science, 2018, 360(6390): 751-758. DOI: 10.1126/science.aar2663.
- [6] Zhao PY, Yao RQ, Zheng LY, et al. Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1-mediated ribophagy protects T lymphocytes against apoptosis in sepsis[J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkac055. DOI: 10.1093/burnst/tkac055.
- [7] 郑丽玉, 姚人骐, 董宁, 等. 核糖体自噬对脂多糖诱导树突细胞凋亡的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2022, 31(10): 1334-1340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2022.10.006.
- [8] Meyer NJ, Prescott HC. Sepsis and septic shock[J]. N Engl J Med, 2024, 391(22): 2133-2146. DOI: 10.1056/NEJMr2403213.
- [9] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, 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): 200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- [10] van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis[J]. Immunity, 2021, 54(11): 2450-2464. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.10.012.
- [11] Torres LK, Pickkers P, van der Poll T. Sepsis-induced immunosuppression[J]. Annu Rev Physiol, 2022, 84: 157-181. DOI: 10.1146/annurev-physiol-061121-040214.
- [12] Zheng LY, Duan Y, He PY, et al. Dysregulated dendritic cells in sepsis: functional impairment and regulated cell death[J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 81. DOI: 10.1186/s11658-024-00602-9.
- [13] Bouras M, Asehnoune K, Roquilly A. Contribution of dendritic cell responses to sepsis-induced immunosuppression and to susceptibility to secondary pneumonia[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2590. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02590.
- [14] Kim HG, Huot JR, Pin F, et al. Reduced rDNA transcription diminishes skeletal muscle ribosomal capacity and protein synthesis in cancer cachexia[J]. FASEB J, 2021, 35(2): e21335. DOI: 10.1096/fj.202002257R.
- [15] Xu WL, Ocak U, Gao LS, et al. Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1369-1392. DOI: 10.1007/s00018-020-03667-9.
- [16] Shim MS, Nettesheim A, Hirt J, et al. The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress[J]. Autophagy, 2020, 16(7): 1248-1261. DOI: 10.1080/15548627.2019.1662584.
- [17] Chagot ME, Boutilliat A, Kriznik A, et al. Structural analysis of the plasmal proteins ZNHIT3 and NUFIP1 provides insights into the selectivity of a conserved interaction[J]. Biochemistry, 2022, 61(7): 479-493. DOI: 10.1021/acs.biochem.1c00792.
- [18] Yuan M, Tu B, Li HC, et al. Cancer-associated fibroblasts employ NUFIP1-dependent autophagy to secrete nucleosides and support pancreatic tumor growth[J]. Nat Cancer, 2022, 3(8): 945-960. DOI: 10.1038/s43018-022-00426-6.
- [19] Ming H, Tan J, Cao SY, et al. NUFIP1 integrates amino acid sensing and DNA damage response to maintain the intestinal homeostasis[J]. Nat Metab, 2025, 7(1): 120-136. DOI: 10.1038/s42255-024-01179-5.
- [20] Sun W, Zhao PY, Hu SD, et al. NUFIP1-engineered exosomes derived from hUMSCs regulate apoptosis and neurological injury induced by propofol in newborn rats[J]. Neurotoxicology, 2024, 102: 81-95. DOI: 10.1016/j.neuro.2024.04.002.
- [21] Hetz C, Zhang KZ, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(8): 421-438. DOI: 10.1038/s41580-020-0250-z.

(收稿日期: 2025-10-22)

(本文编辑: 张耘菲)