

基础研究

论著

膜联蛋白 A1 拟肽 Ac2-26 对重症中暑小鼠炎症反应的保护作用及其机制

王雅雯¹, 吉晶晶², 寸加丽^{2,3}, 刘志锋^{2*}, 张新建^{4*}¹广州中医药大学第三临床医学院麻醉科, 广东广州 510006; ²南部战区总医院内科重症医学科, 广东广州 510010;³南方医科大学第一临床学院重症医学科, 广东广州 510515; ⁴广州中医药大学附属第三医院麻醉科, 广东广州 510378

[中图分类号] R392 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0558.2025.0919

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 王雅雯, 吉晶晶, 寸加丽, 等. 膜联蛋白 A1 拟肽 Ac2-26 对重症中暑小鼠炎症反应的保护作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(11): 1444-1450.

[收稿日期] 2025-03-27 [录用日期] 2025-06-12 [上线日期] 2025-09-19

[摘要] 目的 探讨膜联蛋白 A1(ANXA1)拟肽 Ac2-26 对重症中暑(HS)小鼠的保护作用及其机制。方法 成年健康雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只, 体重 20~25 g; 按照简单随机抽样法分为 4 组($n=6$): 对照组、对照+Ac2-26 组、重症中暑组(HS 组)、重症中暑+Ac2-26 组(HS+Ac2-26 组)。对照+Ac2-26 组和 HS+Ac2-26 组小鼠腹腔注射 Ac2-26(6 mg/kg), 其余两组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。给药 1 h 后将 HS 组和 HS+Ac2-26 组小鼠置于高温高湿[温度(37.0 ± 0.5) °C, 湿度 $75\%\pm 5\%$]模拟环境中, 另两组小鼠始终置于室温[温度(24.0 ± 0.5) °C, 湿度 $40\%\pm 5\%$]环境中, 每 5 min 记录一次肛温; 当 HS 组和 HS+Ac2-26 组小鼠肛温达到 42 °C 时移出高温环境, 置于室温环境中复温 6 h 后收集各组小鼠血液。采用流式细胞术检测中性粒细胞比例, 酶联免疫吸附(ELISA)法检测血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10、IL-4 的表达水平。苏木精-伊红(HE)染色观察肺、肾、肝组织的病理学变化; 进一步对细胞进行转录组测序(RNAseq), 检测中性粒细胞基因表达变化。结果 与对照组比较, 对照+Ac2-26 组小鼠中性粒细胞比例无明显增高、细胞因子水平无明显变化, 肺、肾、肝组织的病理状态无明显变化。与 HS 组比较, HS+Ac2-26 组小鼠体温达到 42 °C 的时间、成模后出现低体温的时间均延长($P<0.05$), 而中性粒细胞比例降低($P<0.05$), 血浆促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 表达水平降低($P<0.05$), 抗炎细胞因子 IL-10 表达水平升高($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 与 HS 组比较, HS+Ac2-26 组小鼠肺、肾、肝组织炎症细胞浸润范围减少。RNAseq 结果显示, 与 HS 组比较, HS+Ac2-26 组小鼠氧化磷酸化信号通路及中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)相关分子表达水平下降。结论 ANXA1 拟肽 Ac2-26 可能通过抑制热打击细胞氧化磷酸化和 NETs 生成从而减轻 HS 小鼠的促炎反应及脏器组织病理损伤。

[关键词] 重症中暑; 膜联蛋白 A1; 中性粒细胞; 炎症**Effect of annexin A1 mimetic peptide Ac2-26 on the inflammatory response in severe heatstroke mice and its protective mechanisms**Wang Ya-Wen¹, Ji Jing-Jing², Cun Jia-Li^{2,3}, Liu Zhi-Feng^{2*}, Zhang Xin-Jian^{4*}¹Department of Anesthesia, the Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China²Department of Medical Intensive Care Unit, General Hospital of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China³Department of Intensive Care Unit, First School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China⁴Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510378, China

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82302484); 广州市科技计划项目(2023A04J2060)

[作者简介] 王雅雯, 硕士研究生, 主要从事重症中暑、免疫学等方面的研究

[通信作者] 张新建, E-mail: mzkzj@163.com; 刘志锋, E-mail: zhifengliu7797@163.com

*Corresponding author. Zhang Xin-Jian, E-mail: mzkzjxj@163.com; Liu Zhi-Feng, E-mail: zhifengliu7797@163.com

This work was supported by National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (82302484), and the Guangzhou Science and Technology Plan Project (2023A04J2060)

[Abstract] Objective To investigate the protective effects of the ANXA1 (Annexin A1) mimetic peptide Ac2-26 on mice with severe heatstroke (HS) and its underlying mechanisms. **Methods** Twenty-four adult healthy male C57BL/6J mice weighing 20–25 g were randomly divided into four groups using a simple random sampling method: control group (Con group), Con+Ac2-26 group, severe heatstroke group (HS group), and severe heatstroke+Ac2-26 group (HS+Ac2-26 group), with 6 mice in each group. Mice in Con+Ac2-26 group and HS+Ac2-26 group were injected intraperitoneally with Ac2-26 (6 mg/kg), and the remaining mice of two groups were injected intraperitoneally with normal saline of equivalent volume. One hour after drug administration, mice in HS group and HS+Ac2-26 group were placed in a high-temperature and high-humidity simulated environment [(37.0±0.5) °C, 75%±5% humidity], while mice in Con group and Con+Ac2-26 were kept in a room temperature and humidity environment [(24±0.5) °C and 40±5% humidity] throughout the experiment. The anal temperature of the mice was recorded every 5 minutes; when the anal temperature of mice in HS group and HS+Ac2-26 group reached 42 °C, they were removed from the high-temperature environment and placed in a room temperature environment for 6 hours of rewarming, after which blood samples of mice in each group were collected. Flow cytometry was used to detect the proportion of neutrophils and the expression levels of Cd11b and Cd62L (molecules related to neutrophil activation). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), IL-10, and IL-4. Hematoxylin-eosin staining (HE staining) was performed to observe the pathological changes in lung, kidney and liver tissues. Furthermore, RNA sequencing (RNA-seq) was conducted to detect changes in neutrophil gene expression. **Results** Compared with Con group, Con+Ac2-26 group showed no significant increase in neutrophil proportion, decreased expression of CD62L and CD11b, no significant changes in cytokine levels, and no obvious pathological changes in lung, kidney, or liver tissues. Compared with HS group, the time for mice in HS+Ac2-26 group to reach an anal temperature of 42 °C and the time to develop hypothermia after model establishment were both prolonged ($P<0.05$); the proportion of neutrophils was reduced ($P<0.05$); the plasma levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were decreased ($P<0.05$); and the plasma level of anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased ($P<0.05$). HE staining results showed that compared with HS group, HS+Ac2-26 group had a reduced range of inflammatory cell infiltration in lung, kidney, and liver tissues. RNA-seq results revealed that compared with HS group, HS+Ac2-26 group had decreased expression levels of molecules related to the oxidative phosphorylation signaling pathways and neutrophil extracellular trap (NETs). **Conclusion** Annexin A1 mimetic peptide Ac2-26 may reduce the pro-inflammatory response and alleviate the heatstroke-induced organ histopathologic damage in heatstroke mice by inhibiting oxidative phosphorylation in heat-stressed cells and NETs formation.

[Key words] severe heatstroke; annexin A1; neutrophil; inflammation

重症中暑 (heat stroke, HS) 是暴露于高热环境下, 出现伴核心体温升高的中枢神经系统功能障碍的重症疾病。随着全球气候变暖和高温的强度和频率增加, HS 的发病率和病死率可能进一步增高^[1]。目前, HS 的病理生理过程被称为“类脓毒症”, 表现为循环系统中的炎症因子风暴和各类免疫细胞数量及比例的改变。本课题组前期建立的重症患者临床数据库分析显示, HS 患者早期表现为以中性粒细胞增多为主的固有免疫系统活化, 而因 HS 死亡的患者则表现为中性粒细胞水平持续升高^[2], 提示早期抑制 HS 的过度炎症反应是阻断病情进展的重要途径。

膜联蛋白 1 (Annexin A1, ANXA1) 属于膜联蛋白家族成员, 是炎症消退过程中的重要抗炎介质。在静息状态下, ANXA1 主要在中性粒细胞中表达; 而在炎症状态下, 其表达可扩展至单核细胞及巨噬细胞, 并可作为分泌性因子释放进入循环系统。既往研究发现, ANXA1 可通过多种方式发挥抗炎作用,

包括抑制中性粒细胞卷曲、黏附, 减轻组织浸润等^[3-6]。Ac2-26 作为 ANXA1 活性短肽可通过模拟 ANXA1 生物学功能, 从而激活一系列多肽受体家族成员。本研究采用 ANXA1 的拟肽 Ac2-26 干预 HS 小鼠模型, 以期探讨其在 HS 中的作用及机制, 旨在为后续开发针对性治疗靶点的药物提供基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂仪器 24 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 购自广州至远生物有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2021-0057]。本研究所使用的实验动物方案均经南部战区总医院实验动物伦理委员会审批 (NBZQZY2024014)。人工气候舱 (上海一恒科技有限公司), 胶囊体温计 (SV223, 深圳市菲明格科技有限公司); Ac2-26 (1845/500U, 英国 Tocris 公司), 红细胞裂解液 (R1010) 及白细胞介素 (interleukin, IL)-6 (abs520004)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor,

TNF- α)(abs520010)、IL-4(abs520003)、IL-10(abs520005)的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自爱必信(上海)生物科技有限公司,流式细胞仪、Cd45-BV421(563890)、Ly6g-APC-Cy7(560600)、Ly6c-PE(562352)流式抗体均购自美国BD Biosciences公司。

1.2 动物模型建立及分组处理 按照简单随机抽样法将24只C57BL/6J小鼠分为4组($n=6$):对照组、对照+Ac2-26组、重症中暑组(HS组)、重症中暑+Ac2-26组(HS+Ac2-26组)。按照说明书将Ac2-26用生理盐水溶解,在建模前1h给予对照+Ac2-26组和HS+Ac2-26组小鼠以Ac2-26(6 mg/kg)腹腔注射,对照组和HS组小鼠则通过腹腔注射等体积0.9% NaCl溶液^[7]。记录各组小鼠初始体温和所处环境条件后,对照组和对照+Ac2-26组小鼠置于室温[温度(24.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C,湿度40% \pm 5%]环境中,HS组和HS+Ac2-26组小鼠置于模拟气候舱中[温度(37.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、湿度75% \pm 5%],每5 min记录一次小鼠肛温,造模终点为肛温达到(42.0 \pm 0.2) $^{\circ}$ C^[8]。将成模小鼠脱离高温高湿环境后置于常温常湿环境中复温,每5 min记录一次小鼠肛温,直至复温6h后结束并记录小鼠体重^[9]。

1.3 取材及指标检测

1.3.1 取材 各组小鼠于造模结束后6h予戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,将麻醉后的小鼠固定在操作板上进行心脏采血,血液分别置于两个1 ml EDTA抗凝管中。第1支抗凝管于4 $^{\circ}$ C下300 \times g离心20 min,收集血浆,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中储存备用。第2支抗凝管按1:3的比例(1 ml血液加入3 ml红细胞裂解液)加入红细胞裂解液,收集剩余细胞用于流式细胞术检测。小鼠于心脏采血后颈椎脱臼处死,分离肺、肾、肝组织,于4%多聚甲醛溶液中固定保存。

1.3.2 ELISA法检测炎症因子 按照ELISA试剂盒说明,在TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-4的预包被酶标板上孵育抗体和酶标抗体后,应用酶标仪在450 nm处进行吸光度值(optical density, OD值)检测,以标准品样本进行标准曲线绘制,根据曲线计算相应的炎症因子表达水平。

1.3.3 流式细胞术检测中性粒细胞比例 将0.1 μ g/ 10^7 个细胞加入相应染色细胞抗体,冰上避光染色15 min后,4 $^{\circ}$ C下150 \times g离心5 min,弃上清,PBS清洗3次后,重悬细胞,调整细胞浓度为 10^6 个细胞/ml,经流式细胞仪检测中性粒细胞亚群比例及细胞膜表面Ly6G的表达水平。

1.3.4 HE染色 将小鼠的肺、肾、肝组织常规进行固定、脱水、透明、石蜡包埋后切片,脱水脱蜡后进行HE染色,于光镜下观察组织的形态学、炎症细胞分布及浸润等病理变化。

1.3.5 小鼠原代中性粒细胞分离及热打击 收集正常

小鼠腿骨骨髓细胞,使用中性粒细胞磁珠分离试剂盒(130-097-658,德国Miltenyi公司)分选出中性粒细胞,分为对照组、对照+Ac2-26组、HS组及HS+Ac2-26组。建模前1h,向HS+Ac2-26组中性粒细胞加入Ac2-26(10 μ mol/L)。将HS组和HS+Ac2-26组中性粒细胞置于高温环境中(43 $^{\circ}$ C,5%CO₂)2h后,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中继续孵育6h。因转录水平先于蛋白水平表达,故将细胞复温1h后收集样本用于RNA测序。

1.3.6 中性粒细胞RNA测序及分析 收集上述4组细胞样本,4 $^{\circ}$ C下300 \times g离心10 min,弃上清,加入1 ml TRIzol试剂提取RNA,将样本进行质量控制、过滤,使用Limma数据包筛选差异基因,使用DESeq2数据包筛选差异基因,随后使用ggplot2数据包对差异基因进行可视化,使用clusterProfiler、org.Mm.eg.db数据包对差异基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,并使用enrichplot数据包对富集结果进行可视化。

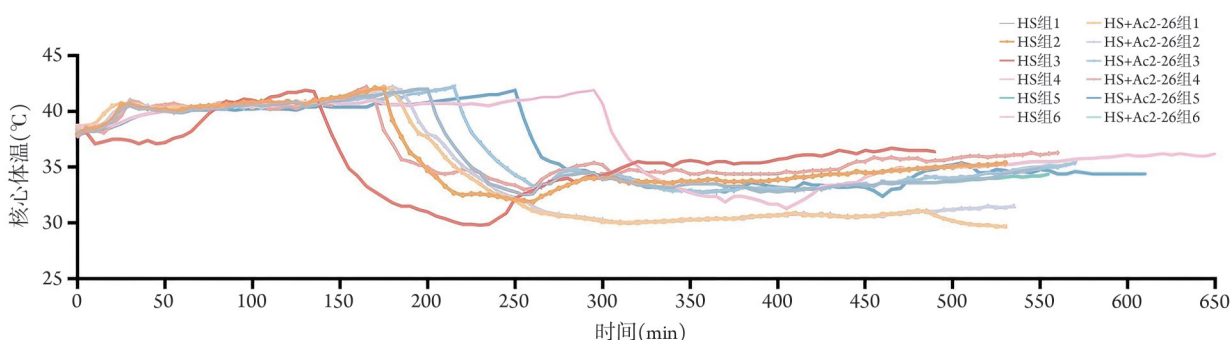
1.4 统计学处理 采用R语言4.0软件进行统计分析。所有数据均为计量资料且符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用Brown-Forsythe法检测方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模期间小鼠核心体温的变化 小鼠置于气候舱[温度(37.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C,湿度75% \pm 5%]后,小鼠体温由正常的37~38 $^{\circ}$ C逐渐开始升温,在3~4 h逐渐升至(42.0 \pm 0.2) $^{\circ}$ C,从气候舱中取出小鼠在室温环境中进行复温,6h后根据各组模型小鼠全程核心体温的变化绘制温度曲线(图1)。低体温(<35 $^{\circ}$ C)是中暑恢复过程中的反应之一,与HS组比较,HS+Ac2-26组小鼠从造模开始至核心体温达到42 $^{\circ}$ C的时间(热负荷)明显延长[(196.70 \pm 32.81) min vs. (160.00 \pm 17.89) min, $P<0.05$],低体温出现的时间[(39.17 \pm 8.61) min vs. (30.00 \pm 4.47) min, $P<0.05$]明显延迟。

2.2 ANXA1拟肽Ac2-26对HS小鼠中性粒细胞比例的影响 流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,对照+Ac2-26组小鼠中性粒细胞比例无明显变化,HS组、HS+Ac2-26组小鼠中性粒细胞比例明显增高($P<0.0001$);与HS组比较,HS+Ac2-26组小鼠的中性粒细胞比例明显降低(55.2% \pm 12.1% vs. 70.8% \pm 8.6%, $P<0.05$)(图2)。

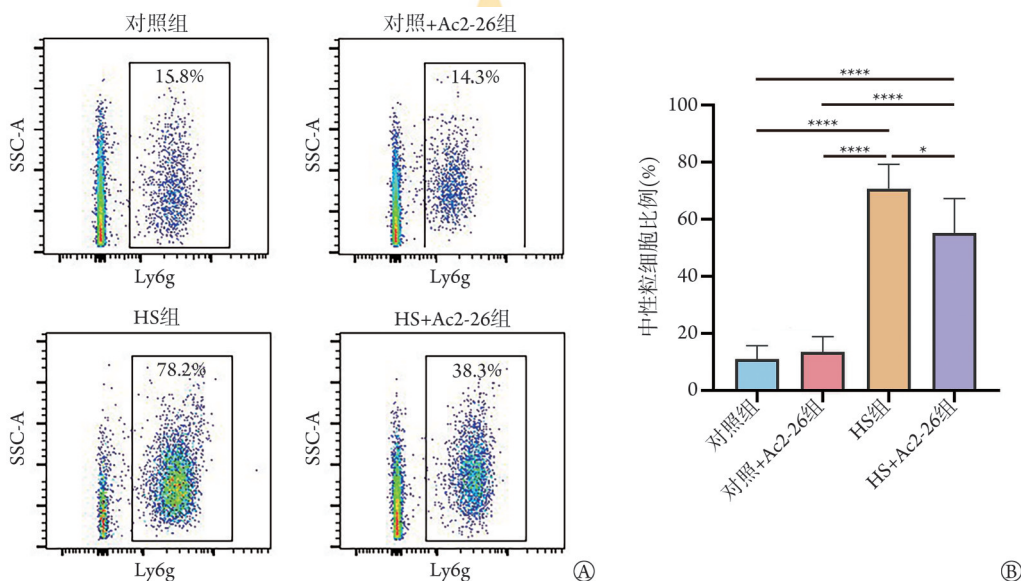
2.3 ANXA1拟肽Ac2-26对HS小鼠炎症因子的影响 与对照组比较,对照+Ac2-26组小鼠血浆中促炎因子TNF- α 、IL-6,抗炎因子IL-10、IL-4表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,HS组小



ANXA1.膜联蛋白A1; HS.重症中暑; ANXA1拟肽Ac2-26未处理及预处理后的温度变化曲线

图1 ANXA1拟肽Ac2-26对造模期间小鼠核心体温变化的影响(n=6)

Fig.1 Effect of the ANXA1 mimetic peptide Ac2-26 on changes in mouse core temperature during modeling (n=6)



ANXA1.膜联蛋白A1; SSC-A.侧向散射光-面积; Ly6g.中性粒细胞标志物; A.中性粒细胞比例流式图; B.中性粒细胞比例柱状图;

*P<0.05, ****P<0.0001

图2 ANXA1拟肽Ac2-26对重症中暑(HS)小鼠中性粒细胞比例的影响(n=6)

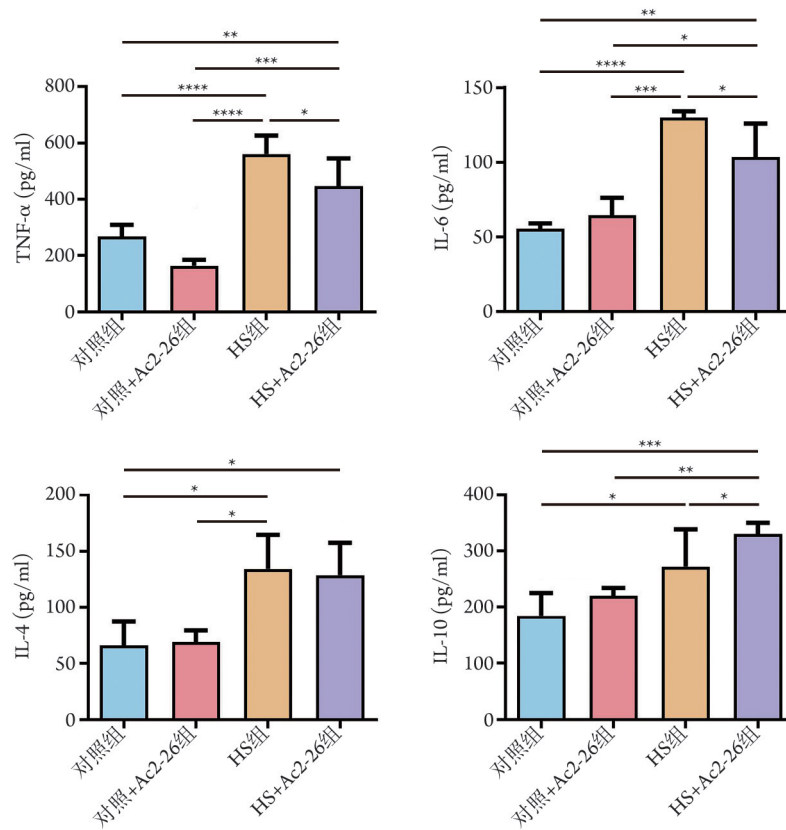
Fig.2 Effect of ANXA1 mimetic peptide Ac2-26 on neutrophil ratio in severe heat stroke (HS) mice (n=6)

鼠血浆中促炎因子TNF- α 、IL-6($P<0.0001$), 抗炎因子IL-10、IL-4($P<0.05$)表达水平平均明显升高。与HS组比较, HS+Ac2-26组小鼠血浆中促炎因子TNF- α [(446.80 \pm 99.01) pg/ml vs. (561.10 \pm 65.71) pg/ml, $P<0.05$]和IL-6 [(103.50 \pm 22.47) pg/ml vs. (129.80 \pm 4.33) pg/ml, $P<0.05$]表达水平明显降低, 抗炎因子IL-10表达水平明显升高[(329.80 \pm 20.21) pg/ml vs. (271.80 \pm 66.63) pg/ml, $P<0.05$], IL-4水平在两组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。

2.4 ANXA1拟肽Ac2-26对HS小鼠主要脏器组织病理损伤的影响 由光镜下(图4)结果可见, 对照组小鼠肺组织排列整齐, 肺泡腔正常, 无过度扩张或狭窄; 对照+Ac2-26组小鼠组织与对照组小鼠组织比较无明显改变; HS组小鼠肺组织明显充血、水肿, 间质增厚, 炎症细胞浸润增多(红色箭头所示); HS+Ac2-26组小鼠肺间质水肿减轻, 肺泡扩张程度与对

照组相似。对照组小鼠肾小管上皮细胞排列整齐, 胞质均匀, 无管腔扩张, 结缔组织分布均匀, 无炎症细胞浸润; 对照+Ac2-26组小鼠组织与对照组小鼠组织比较无明显改变; HS组小鼠肾小管肿胀、炎症细胞明显增多(橙色箭头所示), 部分可见微血栓形成(绿色箭头所示); 与HS组比较, HS+Ac2-26组小鼠肾小管仍可见肿胀, 但炎症细胞浸润较轻, 微血栓形成较少。对照组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞排列规则, 胞质均匀; 对照+Ac2-26组小鼠组织与对照组小鼠组织比较无明显改变; HS组小鼠肝结构紊乱, 肝细胞见广泛空泡化(蓝色箭头所示), 与HS组比较, HS+Ac2-26组小鼠肝细胞空泡样改变减少。

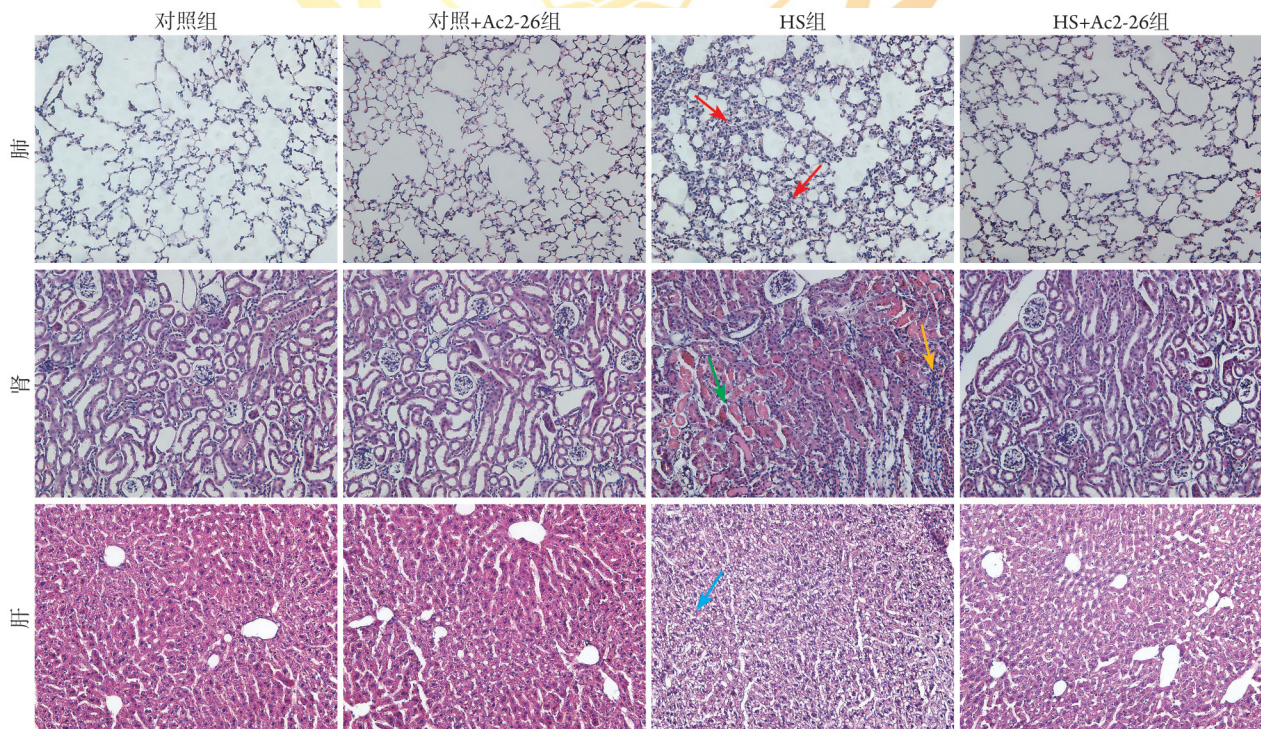
2.5 ANXA1拟肽Ac2-26对热打击中性粒细胞的影响 进一步在细胞实验中进行转录组测序(RNA sequencing, RNAseq), 对HS+Ac2-26组下调基因进行迁移相关分析, 结果发现Ac2-26干预后可抑制单



ANXA1. 膜联蛋白A1; HS. 重症中暑; TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ; IL. 白细胞介素; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001

图3 ANXA1拟肽Ac2-26对HS小鼠血浆中炎症因子的影响($n=6$)

Fig.3 Effect of the ANXA1 mimetic peptide Ac2-26 on inflammatory factors in the plasma of mice with severe heat stroke ($n=6$)



ANXA1. 膜联蛋白A1; HS. 重症中暑; 肺间质增厚, 炎症细胞浸润增多(红色箭头所示); 肾炎细胞浸润增多(橙色箭头所示); 肾小管中微血栓形成(绿色箭头所示); 肝组织排列紊乱, 肝细胞空泡样改变增多(蓝色箭头所示)

图4 ANXA1拟肽Ac2-26对HS小鼠肺、肾、肝组织病理学影响(HE $\times 200$, $n=3$)

Fig.4 Histopathological effects of ANXA1 mimetic peptide Ac2-26 on lung, kidney, and liver histopathology in mice with severe heatstroke(HE $\times 200$, $n=3$)

个核迁移及脂质体转运(附图 1A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0558.2025.0919FJ>)。KEGG 富集基因降维聚类分析显示, Ac2-26 可抑制中性粒细胞氧化磷酸化通路和中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)生成(附图 1B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0558.2025.0919FJ>)。差异基因富集分析显示, 与 HS 组比较, HS+Ac2-26 组小鼠氧化磷酸化信号通路相关分子如泛醌氧化还原酶(NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit S6, NDUFS6)、细胞色素 C 氧化酶 1/4(cytochrome C oxidase, COX1/4)表达水平明显降低(附图 2A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0558.2025.0919FJ>), NETs 相关分子如中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达水平明显降低(附图 2B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0558.2025.0919FJ>)。

3 讨 论

本研究结果表明, ANXA1 拟肽 Ac2-26 可能通过抑制热打击细胞氧化磷酸化和 NETs 生成, 从而降低 HS 小鼠的中性粒细胞比例, 抑制中性粒细胞活化程度, 降低血浆促炎细胞因子表达水平, 同时促进抗炎细胞因子表达水平升高, 减轻 HS 小鼠的肺、肾、肝组织的病理学损伤。

当机体暴露于高温环境或强体力劳动时, 在代偿期体温可能会出现一定程度的升高。目前认为, 38.5 °C 为热耐受的安全范围上限, 在该阶段进行有效的降温处理则多数不会进展至 HS, 38.5 °C 也是目前人体热耐受试验的体温阈值^[10]。在动物造模期间, 小鼠同样存在体温上升平台期, 即在进入高温模拟环境后, 短期内出现体温迅速升高, 至 38.5 °C 左右进入平台期, 该段时间反映了小鼠对热负荷的耐受能力, 且与总成模时间明显相关^[11]。此外, 中暑后机体的核心体温降低与生存预后存在明显的关联, 且低体温出现的时间越早、程度越深、持续时间越长, 则中暑患者预后越差^[12]。本研究发现, Ac2-26 干预可延长小鼠的热耐受时间, 且 Ac2-26 干预组小鼠出现低体温的时间也明显延长。临床工作中发现, 轻症中暑患者经过有效的降温后可迅速恢复, 甚至无需住院治疗, 但 HS 患者即使体温降至正常后, 仍然会出现进行性的脏器功能损伤^[13-14], 提示 HS 时极度的高温启动了机体炎症-免疫-内皮-凝血紊乱, 即使直接热损伤已被去除, 但已经启动的炎症-免疫-内皮-凝血紊乱仍将持续, 从而成为导致脏器损伤及不良预后的重要因素。在动物实验中, 用小鼠模拟临床患者, 在其出现 HS 后又脱离高温环境(即复温), 同样发现复温后小鼠体内的炎症水平及脏器损

伤仍然持续加重, 而 6 h 是最接近临床中炎症免疫紊乱的时间点。由于本研究聚焦于 HS 炎症紊乱的干预靶点研究, 因此选择 6 h 作为样本的检测时间点^[9]。

为进一步明确 ANXA1 确切作用机制, 本研究进行了细胞层面的 RNA 测序, 结果显示, 抑制热打击后中性粒细胞氧化磷酸化和 NETs 生成可能是 ANXA1 抑制中性粒细胞的分子机制。活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成是中性粒细胞活化的标志之一^[15], 在正常情况下, 线粒体电子传递链通过一系列电子传递反应驱动氧化磷酸化过程, 从而生成细胞所需的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP), ROS 是这一过程中的副产物之一。在氧化磷酸化过程中, 线粒体电子传递链(尤其是复合物 I 和 III)在传递电子时, 部分电子会直接与氧分子(O₂)结合, 生成超氧阴离子(O₂⁻), 这是 ROS 的初级形式。超氧阴离子可被超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)转化为过氧化氢(H₂O₂), 后者在铁离子(Fe²⁺)存在时通过芬顿反应生成高毒性的羟基自由基(·OH)^[16]。在 HS 的细胞及动物模型中, 均发现 ROS 水平明显升高, 而通过抑制 ROS 水平可明显缓解 HS 模型的脏器损伤^[17-19]。本研究通过 RNA 测序发现, Ac2-26 干预后, 可显著下调中性粒细胞氧化磷酸化信号通路相关分子如 NDUFS6、COX1/4, 抑制 ROS 生成可能是其作用机制之一。进一步分析发现, ROS 通过激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen oxidases, Nox)和 MPO, 触发中性粒细胞内氧化磷酸化信号通路, 诱导染色质解聚和组蛋白瓜氨酸化(依赖 PAD4 酶), 从而启动 NETs 形成过程, 即 NETosis^[20]。在中暑小鼠中 NETs 生成显著增多, 且与其脏器功能损伤相关, 而阻断 NETs 后可减轻中暑小鼠的肺、肝等脏器损伤^[21]。此外, 中暑后 NETs 形成增多被认为与弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)的发生相关^[22], 而 DIC 是导致 HS 患者死亡的重要原因^[23]。本研究发现, Ac2-26 干预后, NETs 形成的相关分子 MPO、NE 等显著降低, 提示抑制 NETs 形成是其抑制中性粒细胞促炎特性, 进而改善脏器损伤及预后的另一机制。

全身炎症反应被认为是 HS 失代偿期的核心机制; 这一观点于 2019 年发表于《新英格兰医学杂志》, 在 2022 年发表于《自然》系列杂志的综述再次强调了固有免疫系统活化在促进热射病发展中的作用^[14,24]。HS 患者及动物模型均表现出炎症因子风暴, 循环系统中 IL-6、TNF-α 等水平均明显升高^[25]; 也有临床证据表明, 血浆中炎症因子的水平与脏器损伤的程度呈正相关^[26]; 通过给予抑制炎症相关信号通路的分子, 可显著抑制 HS 动物模型的炎症反应

程度,从而提高生存率^[27]。本研究发现,HS小鼠血浆促炎因子浓度升高,Ac2-26干预可降低血浆中促炎因子水平,同时减轻脏器的组织病理学损伤。综上,Ac2-26对中性粒细胞具有保护作用,且中性粒细胞是循环系统中数量最多的炎症细胞,中性粒细胞的组织浸润是HS多脏器损伤的重要机制;ANXA1拟肽Ac2-26可能通过抑制中性粒细胞活化、浸润,进而在HS治疗中发挥保护作用。

尽管全身炎症反应被认为在热射病中扮演重要的角色,然而,这一结论主要来源于类似疾病病理生理过程的推测,仍缺乏直接证据。因此,在临床治疗中,多数治疗主要靶向体温管理和脏器功能支持,而免疫支持策略则未被包含在内,至少在急性期的管理中多数指南未提及免疫调理^[28]。本研究发现,ANXA1拟肽Ac2-26可增强HS小鼠的热耐受能力,通过抑制中性粒细胞活化及浸润,进而在HS治疗中发挥保护作用,为后续的药物应用转化、临床救治提供了基础实验依据,具有较强的转化意义。但本研究也存在一定局限性,如测序所得的ANXA1拟肽Ac2-26可能通过抑制热打击细胞氧化磷酸化和NETs生成的结论缺乏更多的实验依据,后续将持续对上述通路进行验证。

【参考文献】

- [1] Xie Y, Zhou Z, Sun Q, *et al.* Social-economic transitions and vulnerability to extreme temperature events from 1960 to 2020 in Chinese cities[J]. *iScience*, 2024,27(3):109066.
- [2] Ji J, Su P, Lin W, *et al.* Immune cells characteristics and their prognostic effects in exertional heatstroke patients: a retrospective cohort study[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 867774.
- [3] Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, *et al.* Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 8239258.
- [4] Perretti M, Solito E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt3): 507-510.
- [5] Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis[J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(2): 249-258.
- [6] Sanches JM, Rossato L, Lice I, *et al.* The role of annexin A1 in *Candida albicans* and *Candida auris* infections in murine neutrophils[J]. *Microb Pathog*, 2021, 150: 104689.
- [7] Zhang LL, Jia BW, Zhuo ZP, *et al.* Ac2-26 reduced lung injury after cardiopulmonary bypass *via* the AKT1/GSK3 β /ENOS pathway[J]. *J Surg Res*, 2024, 301: 324-335.
- [8] Wang L, Song Y, Zhang P, *et al.* Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor alleviates heatstroke-induced acute kidney injury by activating BNIP3-mediated mitophagy[J]. *FASEB J*, 2024, 38(12): e23723.
- [9] Zhou J, Qin X, Li L, *et al.* Heat stress-induced intestinal epithelial cells necroptosis *via* TLR3-TRIF-RIP3 pathway was dependent on p53[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110574.
- [10] Lundby C, Svendsen IS, Urianstad T, *et al.* Training wearing thermal clothing and training in hot ambient conditions are equally effective methods of heat acclimation[J]. *J Sci Med Sport*, 2021, 24(8): 763-767.
- [11] 吉晶晶,李俊,李慧,等.乌司他丁对重症中暑小鼠心功能损害的保护作用及机制研究[J].*解放军医学杂志*, 2017, 42(4): 290-294.
- [12] 刘亚楠,耿焱,付炜,等.经典型热射病大鼠恢复期体温变化与预后的关系[J].*解放军医学杂志*, 2013, 38(10): 818-821.
- [13] 苏磊.重症中暑防治回顾与启示[J].*解放军医学杂志*, 2011, 36(9): 883-885.
- [14] Epstein Y, Yanovich R. Heatstroke[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(25): 2449-2459.
- [15] Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 459-489.
- [16] Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101674.
- [17] Pan Z, He X, Shao Y, *et al.* ROS/JNK-mediated lysosomal injury in rat intestinal epithelial-6 cells during heat stress[J]. *J Therm Biol*, 2022, 109: 103326.
- [18] Ni XX, Nie J, Xie QY, *et al.* Protective effects of hyperbaric oxygen therapy on brain injury by regulating the phosphorylation of Drp1 through ROS/PKC pathway in heatstroke rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(8): 1253-1269.
- [19] Li L, Tan H, Zou Z, *et al.* Preventing necroptosis by scavenging ROS production alleviates heat stress-induced intestinal injury[J]. *Int J Hyperthermia*, 2020, 37(1): 517-530.
- [20] Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 365.
- [21] Wang F, Zhang Y, Sun M, *et al.* Single-cell sequencing reveals the same heterogeneity of neutrophils in heatstroke-induced lung and liver injury[J]. *Mucosal Immunol*, 2025, 18(3): 742-756.
- [22] Zhang Y, Deng X, Zhang J, *et al.* A potential driver of disseminated intravascular coagulation in heat stroke mice: neutrophil extracellular traps[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(19): 12448.
- [23] Zhong L, Shuai F, Wang C, *et al.* Serum procalcitonin levels are associated with rhabdomyolysis following exertional heatstroke: an over 10-year intensive care survey[J]. *World J Emerg Med*, 2024, 15(1): 23-27.
- [24] Bouchama A, Abuyassin B, Lehe C, *et al.* Classic and exertional heatstroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 8.
- [25] Leon LR, Bouchama A. Heat stroke[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2): 611-647.
- [26] Lu KC, Wang JY, Lin SH, *et al.* Role of circulating cytokines and chemokines in exertional heatstroke[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(2): 399-403.
- [27] Tao Z, Cheng M, Wang SC, *et al.* JAK2/STAT3 pathway mediating inflammatory responses in heatstroke-induced rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6732-6739.
- [28] Barletta JF, Palmieri TL, Toomey SA, *et al.* Society of critical care medicine guidelines for the treatment of heat stroke[J]. *Crit Care Med*, 2025,53(2): e490-e500.

(责任编辑: 张小利)