

• 基础研究 •

Tyro3 缺失加重 LPS 诱导的小鼠内毒素血症

汪洁, 方瑞琪, 李猛, 杨青, 柏惠, 李晓宇*, 陈琪

江苏省心血管病靶向干预研究重点实验室, 南京医科大学基础医学院病理生理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探究Tyro3蛋白酪氨酸激酶(Tyro3 protein tyrosine kinase, Tyro3)在内毒素血症中的作用及其分子调控机制。方法: 基于GEO数据库(GSE54514)分析脓毒症患者外周血Tyro3的表达谱; 建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导(10 mg/kg, 腹腔注射)的内毒素血症小鼠模型, 比较Tyro3全身基因敲除(Tyro3^{-/-})与野生型(Tyro3^{+/+})小鼠的疾病严重程度(临床评分、96 h生存率)、血浆炎症因子水平及肝脏急性炎症病理改变。同时, 分离培养Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠的骨髓源性巨噬细胞, 通过LPS(100 ng/mL)刺激建立体外急性炎症模型, 检测LPS诱导的核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)炎症通路的激活情况。结果: 临床数据分析显示脓毒症患者外周血Tyro3表达显著下调。动物实验表明, 与Tyro3^{+/+}小鼠相比, Tyro3^{-/-}小鼠表现出更严重的脓毒症表现: 临床评分显著降低, 生存率显著下降, 血浆炎症因子水平显著升高, 肝脏急性炎症损伤更严重, 炎症细胞浸润更明显。体外实验研究发现, Tyro3缺失导致巨噬细胞NF-κB通路过度激活, 表现为kappa B抑制因子激酶(inhibitor of kappa B kinase, IKK)、NF-κB p65亚基的磷酸化水平增加及核因子κB抑制蛋白α(NF-kappa-B inhibitor alpha, IκB-α)的降解加速。使用蛋白S(protein S, Pros1)激活Tyro3可以有效抑制LPS诱导的NF-κB通路激活。结论: Tyro3通过负调控巨噬细胞NF-κB信号通路减轻内毒素血症诱导的相关炎症反应及肝脏损伤, 提示靶向Tyro3-NF-κB轴可能是内毒素血症治疗的潜在策略。

[关键词] Tyro3; 内毒素血症; 巨噬细胞; 炎症; NF-κB

[中图分类号] R392.32

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)08-1123-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN250607

Deletion of Tyro3 exacerbates LPS-induced endotoxemia in mice

WANG Jie, FANG Ruiqi, LI Meng, YANG Qing, BAI Hui, LI Xiaoyu*, CHEN Qi

Key Laboratory of Targeted Intervention of Cardiovascular Disease, Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of Tyro3 protein tyrosine kinase (Tyro3) in the pathogenesis of endotoxemia and its underlying molecular mechanisms. **Methods:** The expression profile of Tyro3 in peripheral blood from septic patients was analyzed using the GEO database (GSE54514). An endotoxemia mouse model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg). Disease severity - including clinical scores, 96-hour survival rates, plasma inflammatory cytokine levels, and acute hepatic inflammatory pathology - was evaluated and compared between systemic Tyro3 knockout (Tyro3^{-/-}) and wild-type (Tyro3^{+/+}) mice. Additionally, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were isolated from Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice and stimulated with LPS (100 ng/mL) to establish an *in vitro* acute inflammation model. Activation of the nuclear factor kappa-B (NF-κB) signaling pathway was assessed. **Results:** Clinical data analysis revealed a significant downregulation of Tyro3 expression in the peripheral blood of septic patients. *In vivo* experiments demonstrated that Tyro3^{-/-} mice exhibited exacerbated endotoxemia compared to Tyro3^{+/+} mice, as evidenced by significantly worsened clinical scores, reduced survival rates, elevated plasma inflammatory cytokine levels, more severe acute liver injury, and increased inflammatory cell infiltration. *In vitro* studies showed that Tyro3 deficiency led to hyperactivation of the NF-κB pathway in macrophages, characterized by enhanced phosphorylation of inhibitor of kappa B kinase (IKK) and the p65 subunit of NF-κB, along with accelerated degradation of NF-kappa-B inhibitor alpha (IκB-α). Pharmacological activation of Tyro3 using protein S (Pros1) effectively suppresses NF-κB pathway activation. **Conclusion:** Tyro3 attenuates endotoxemia-induced inflammatory responses and hepatic injury by negatively regulating the NF-κB signaling pathway in macrophages, suggesting that

[基金项目] 国家自然科学基金(82030012, 81670263); 江苏高等学校自然科学基金(24KJA310003)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xyli@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-2659-7680)

pharmacological targeting of the Tyro3-NF- κ B axis may represent a novel therapeutic strategy for endotoxemia management.

[Key words] Tyro3; endotoxemia; macrophages; inflammatory response; NF- κ B

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(08): 1123-1131]

内毒素血症是由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的过度免疫反应所导致的危及生命的临床综合征^[1],是脓毒症的常见触发因素,被视为脓毒症的亚型或早期阶段,目前仍缺乏有效的治疗手段^[2]。在脓毒症发病过程中,大量促炎细胞因子释放可引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF),甚至死亡^[3-4]。尽管近年来在脓毒症的病理机制研究方面取得了重要进展,但其复杂的分子调控机制仍未完全阐明,临床治疗策略仍面临巨大挑战^[5]。

LPS是革兰阴性菌外膜的重要成分^[6],在与Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)结合时触发炎症,激活多种信号通路,其中,核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路作为炎症与免疫应答的核心枢纽,通过调控多种促炎细胞因子、趋化因子及黏附分子的表达,在机体防御系统中发挥关键作用^[7]。这一信号通路在脓毒症发病过程中被过度激活,导致炎症介质的爆发性释放,进而诱发全身炎症反应^[8]。目前研究发现多种内源性负调控分子通过各自不同的分子机制共同维持NF- κ B信号活化的动态平衡,防止炎症反应的过度激活^[9]。

Tyro3蛋白酪氨酸激酶作为TAM(Tyro3、Axl、Mer)受体酪氨酸激酶家族的重要成员,不仅参与细胞增殖、凋亡等生理过程,还在免疫调节中发挥关键作用^[10-11]。然而,Tyro3是否可以通过调控巨噬细胞NF- κ B通路影响LPS诱导的急性炎症反应及肝脏损伤,目前尚无报道。本研究分析了脓症患者外周血Tyro3的表达改变;并利用Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠构建LPS诱导的内毒素血症模型,结合体外巨噬细胞实验,系统探讨了Tyro3对内毒素血症的作用及其调控巨噬细胞NF- κ B炎症通路的分子机制。这些发现不仅确立了Tyro3在先天免疫中的关键调控作用,更为靶向Tyro3-NF- κ B轴治疗内毒素血症及相关炎症性疾病提供了新的治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所使用的Tyro3基因敲除小鼠由美国Jackson

实验室提供(编号:007937),南京集萃药康生物科技有限公司代为繁育。C57BL/6小鼠购自南京医科大学动物实验中心。所有实验操作均遵循《动物实验的伦理准则与指南》并获得南京医科大学伦理委员会审批(IACUC-2102028)。

LPS(Sigma公司,美国),巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)、BCA Protein Assay Reagent Kit、蛋白S(protein S, Pros1)(Thermo公司,美国),小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(杭州联科生物),天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate-transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640培养基、青霉素-链霉素(Gibco公司,美国),ECL显影液(山东思科捷公司)。p-IKK抗体、IKK抗体、I κ B- α 抗体、p65抗体(CST公司,美国),p-p65抗体(Santa公司,美国),Tyro3抗体(Novus公司,美国),GAPDH抗体(武汉三鹰生物公司),Anti-Mouse IgG-HRP、Anti-Rabbit IgG-HRP(南京贝斯特生物公司),TRIzol(TaKaRa公司,日本),逆转录试剂盒、RT-qPCR试剂(南京诺唯赞公司),各种RT-qPCR引物序列由南京擎科生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实验模型

本研究使用雄性小鼠以避免雌激素对内毒素血症小鼠生存和炎症的可能影响,选取8周龄C57BL/6小鼠(Tyro3^{+/+})作为野生型对照组,Tyro3^{-/-}小鼠作为敲除型对照组,8周龄雄性Tyro3^{+/+}、Tyro3^{-/-}小鼠腹腔注射LPS(10 mg/kg)12 h后通过吸入CO₂实施安乐死用于分析炎症表型;腹腔注射LPS(10 mg/kg)96 h后,计算小鼠生存率。

提取Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠的骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM),LPS刺激0、15、30 min后收取蛋白用于炎症通路分析。

1.2.2 临床评分

小鼠在LPS注射后0、6、12 h以双盲法方式进行临床评分。在指定的时间点,通过对结膜炎、粪便、

皮毛和对刺激的反应进行分级来评估动物的症状,计算3次评估的平均值。结膜炎:0分,闭眼或流泪伴有浆液性分泌物;1分,睁开眼睛有浆液性分泌物;2分,正常,无结膜炎。粪便:0分,腹泻;1分,稀便;2分,正常粪便。毛皮:0分,未梳理,皮毛粗糙暗沉;1分,梳理减少,毛发粗糙;2分,有整洁、光泽的皮毛。对刺激的反应:0分,昏昏欲睡,刺激后仅抬起头部;1分,刺激后不活跃,警觉性降低,触碰刺激后走不到2步;2分,正常的运动和反应,触碰刺激后走步超过2步。总分最高为8分,表示健康状况正常。

1.2.3 小鼠造模标本收集

造模结束后三溴乙醇麻醉小鼠,进行眼球取血(EDTA抗凝),颠倒混匀,静置,4℃离心机3 000 r/min离心20 min后,取上清-80℃冻存备用,用生理盐水进行全身灌流后收取小鼠肝脏,部分组织放入液氮罐速冻,-80℃保存;部分组织放入4%多聚甲醛溶液中固定。

1.2.4 ELISA

按照试剂盒说明检测小鼠血浆TNF- α 和IL-6含量。

1.2.5 HE染色

小鼠肝脏经4%多聚甲醛溶液固定过夜后,石蜡包埋切片,将切片脱蜡至水之后进行苏木素染色,分化和蓝化后进行伊红染色,之后进行脱水和透明化,最后封片,显微镜下观察。

1.2.6 生化检测

按照制造商的方案,使用生化试剂盒评估小鼠血清AST、ALT、ALP水平,利用酶标仪进行检测。

1.2.7 RT-qPCR实验

取少许肝脏组织,TRIzol提取组织RNA,测定RNA浓度后,使用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,通过RT-qPCR扩增目的基因,GAPDH作为内参,校正每个样本目的基因的Ct值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示基因的相对表达水平,引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences used in RT-qPCR

Gene	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
TNF- α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCGAAGTTCAGTAG
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IFN- β	CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC	GGCAGTGTAActCTTCTGCAT
GAPDH	TGCGACTTCAACAGCAACTC	CTTGCTCAGTGTCTTGTCTG

1.2.8 小鼠BMDM的分离与培养

收集4周龄C57BL/6雄性小鼠股骨和胫骨,分离骨髓,将细胞在含有10% FBS、1%青链霉素、M-CSF(20 ng/mL)的RPMI 1640培养液中培养7 d,每3 d更换1次培养液,待骨髓前体细胞分化为BMDM后,用LPS(100 ng/mL)处理细胞。

1.2.9 蛋白质免疫印迹实验

提取小鼠BMDM蛋白,BCA法测定蛋白浓度并定量,每个样品孔上样量为30 μ g。随后进行电泳,转膜,封闭,一抗4℃冰箱孵育过夜。第2天用TBST缓冲液洗涤PVDF膜,室温二抗孵育1.5 h,洗涤PVDF膜后曝片成像。

1.3 统计学方法

所有数据使用GraphPad Prism 9软件进行数据分析,所有数据均以至少3次独立实验的均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据分析采用t检验、单因素方差分析、双因素方差分析,在双因素方差分析中,小鼠基因型和造模处理变量作为两个独立因素纳入模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

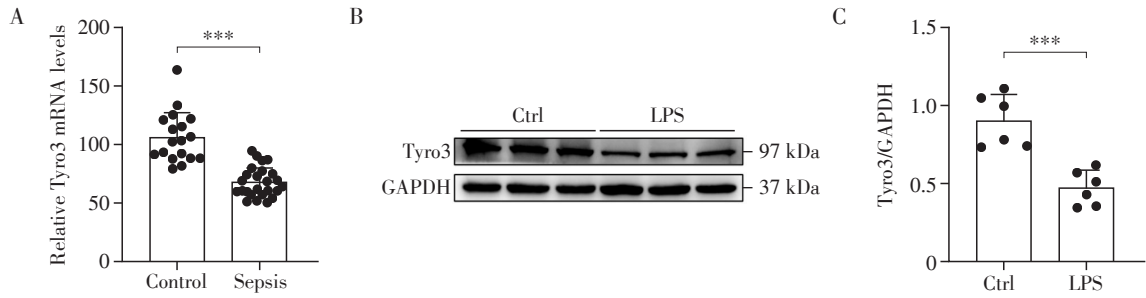
2 结果

2.1 LPS诱导内毒素血症后小鼠肝脏组织Tyro3表达降低

为探究Tyro3在人脓毒症中的潜在作用,通过GEO数据库(GSE54514)对脓毒症幸存患者和对照健康人群全血中Tyro3的转录水平进行分析。结果发现,与健康对照组相比,脓毒症幸存患者外周血中Tyro3的表达水平显著下调(图1A),提示Tyro3可能在脓毒症病理过程中发挥重要作用。由于内毒素血症被视为脓毒症的亚型或早期阶段,为进一步验证这一发现,取8周龄雄性Tyro3^{+/+}小鼠,随机分为生理盐水对照组和LPS处理组(10 mg/kg,腹腔注射)。通过LPS刺激12 h构建小鼠内毒素血症模型,发现LPS处理组小鼠肝脏组织中Tyro3蛋白的表达水平较对照组显著降低(图1B、C)。这一结果与临床数据分析结果一致,提示Tyro3在脓毒症发生发展中可能发挥重要作用。

2.2 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠脓毒症表现
为探究Tyro3在LPS诱导的小鼠脓毒症中的作用,本研究采用Tyro3基因敲除小鼠(Tyro3^{-/-})进行实验。如图2A所示,Tyro3^{-/-}小鼠肝脏组织中未见Tyro3蛋白的表达,证实小鼠的肝脏Tyro3被成功敲除。实验选用8周龄雄性Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠,分

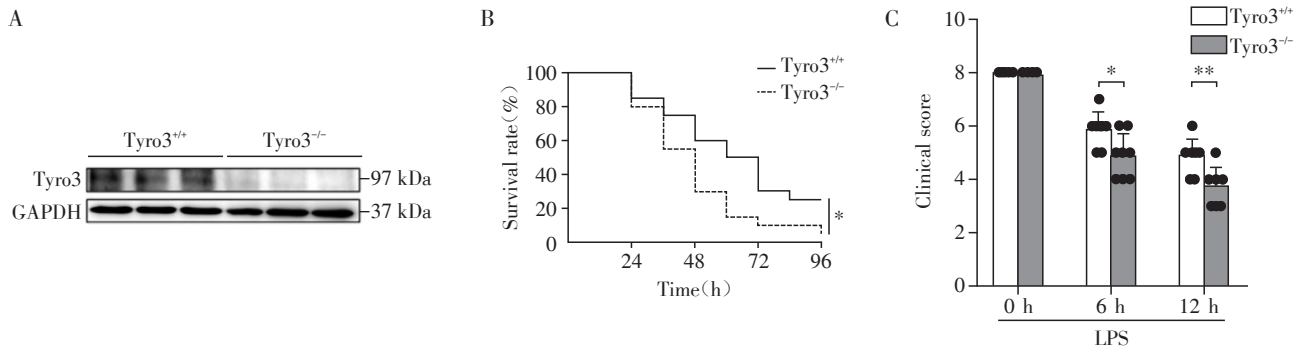
别腹腔注射生理盐水或LPS(10 mg/kg),持续观察96 h。每隔12 h记录1次小鼠的生存情况,并在注射后6 h和12 h进行临床评分,以评估小鼠的活力状态。实验结果显示,LPS造模后,小鼠的活力和生存率均显著降低,其中Tyro3^{-/-}小鼠的下降趋势更为明显(图2B、C)。



A: Comparative transcriptomic profiling of Tyro3 expression in whole blood samples from survivors of sepsis and matched healthy controls using the GSE54514 GEO database (Control: n=18; Sepsis: n=26). B, C: Western blot analysis was performed to determine the expression levels of Tyro3 in liver tissues of Tyro3^{+/+} mice following intraperitoneal injection with either normal saline (Ctrl) or LPS(10 mg/kg). Representative immunoblot image(B) and densitometric quantification(C) are shown. ***P < 0.001 (n=6).

图1 Tyro3在脓毒血症患者外周血及LPS诱导的脓毒血症小鼠肝脏中表达降低

Figure 1 The expression levels of Tyro3 were downregulated in peripheral blood of sepsis patients and in the liver of LPS-induced septic mice



Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice were intraperitoneally injected with either saline or LPS (10 mg/kg) for 96 h. A: Identification of Tyro3 knockout mice. B: The survival rates of Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice within 96 h post-LPS challenge. C: The clinical scores of Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice at 0, 6, and 12 h post-LPS challenge. *P < 0.05, **P < 0.01 (n=8).

图2 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠脓毒症表现

Figure 2 Tyro3 deficiency exacerbated the manifestations of LPS-induced sepsis in mice

2.3 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠全身性炎症
将8周龄雄性Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠随机分为两组,分别腹腔注射生理盐水或LPS(10 mg/kg)。注射12 h后,提取小鼠肝脏组织RNA,通过RT-qPCR检测炎症因子IL-6、TNF-α和IL-1β的mRNA相对表达水平,并用管家基因GAPDH进行归一化处理。结果显示,LPS处理后,Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠肝脏中IL-6、TNF-α和IL-1β的mRNA水平均显著增加;且Tyro3^{-/-}小鼠的增加幅度显著大于Tyro3^{+/+}小鼠(图3A~C),说明Tyro3的缺失可以加重LPS诱导的肝脏炎症。

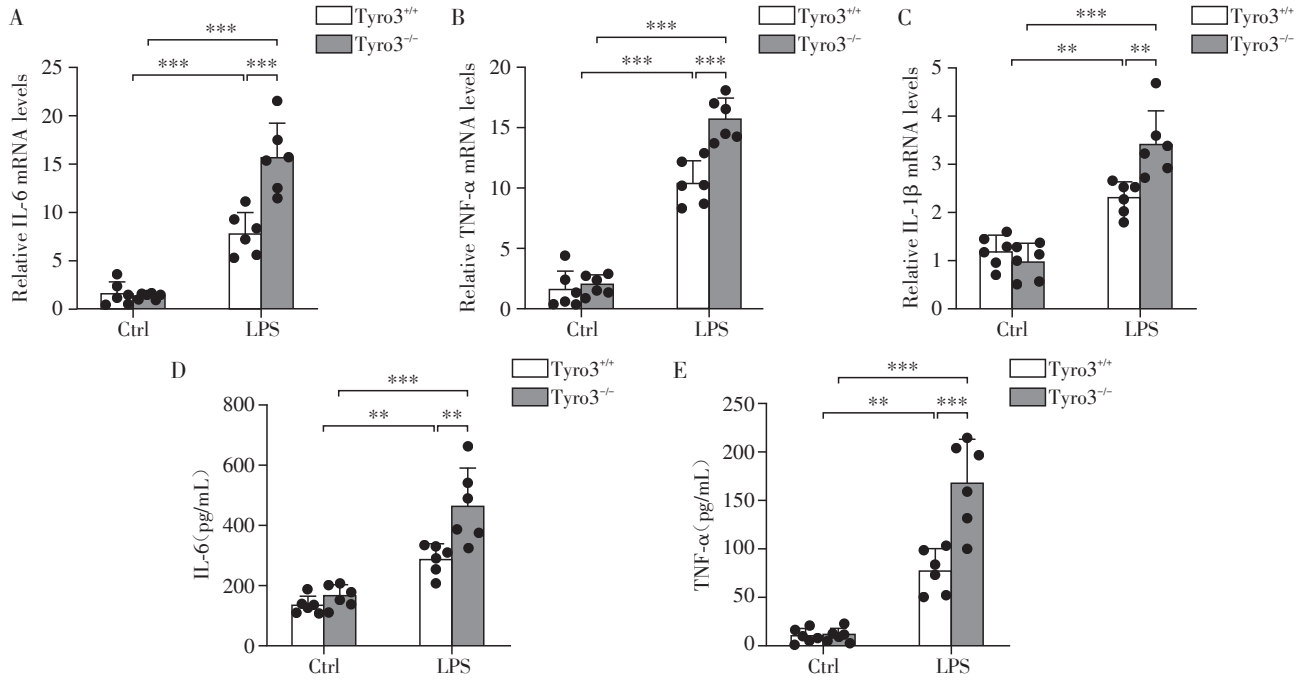
同时采集小鼠抗凝全血,离心分离血浆,采用ELISA法检测血浆中炎症因子IL-6和TNF-α的水平,结果显示,LPS处理后,两组小鼠的IL-6和TNF-α水平均显著升高,且Tyro3^{-/-}小鼠的升高幅度明显大于Tyro3^{+/+}小鼠,这与RT-qPCR检测结果一致(图3D、E)。

2.4 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠急性肝损伤

将8周龄雄性Tyro3^{+/+}和Tyro3^{-/-}小鼠随机分为两组,分别腹腔注射生理盐水或LPS(10 mg/kg)。12 h后处死小鼠,收取肝脏组织,立即用4%多聚甲醛固定24 h,随后进行石蜡包埋并制备切片。HE染色结果

显示,LPS造模后,肝脏损伤明显,出血严重,大量炎细胞浸润(黑色箭头所指),Tyro3^{-/-}小鼠肝脏病理损伤更严重(图4A、B)。在LPS造模后,Tyro3^{+/+}和

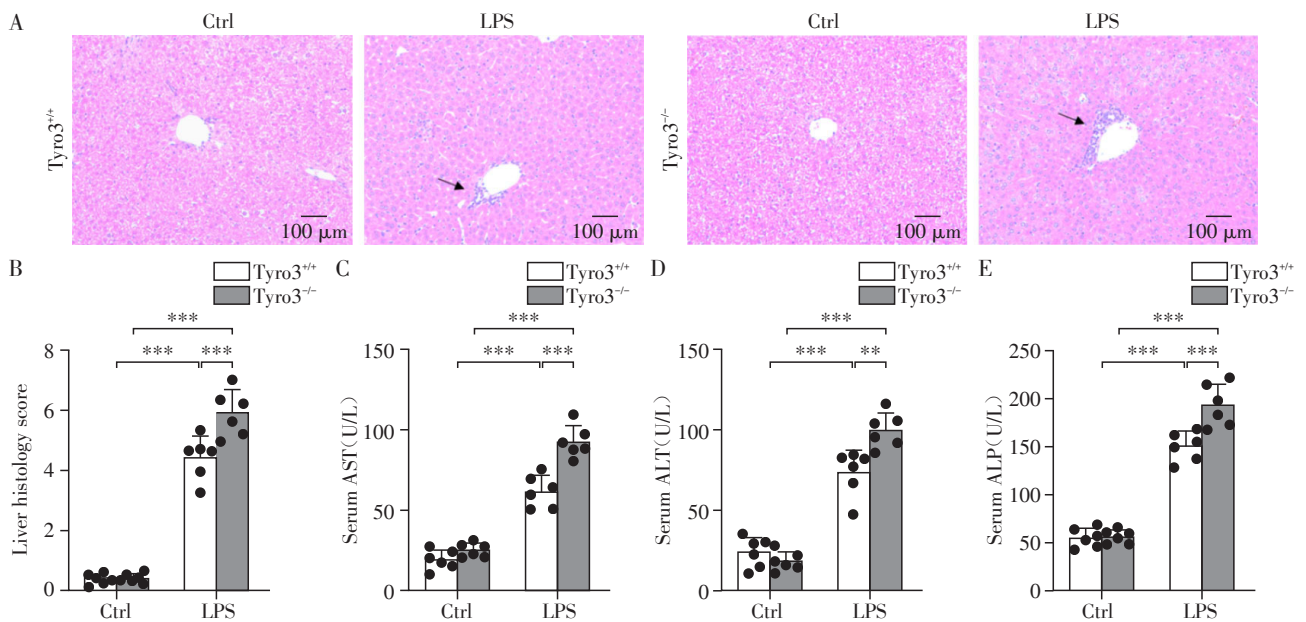
Tyro3^{-/-}小鼠血浆中AST、ALT和ALP水平均明显上升,Tyro3^{-/-}小鼠上升更明显,这进一步证明Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠急性肝损伤(图4C~E)。



Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice were intraperitoneally injected with either normal saline (Ctrl) or LPS (10 mg/kg) for 12 h. A-C: The mRNA levels of hepatic inflammatory cytokines IL-6 (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) relative to the housekeeping gene GAPDH were quantified by RT-qPCR in mice. D, E: ELISA was used to measure the levels of plasma inflammatory cytokines IL-6 (D) and TNF- α (E) in mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=6$).

图3 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠全身炎症

Figure 3 Tyro3 deficiency exacerbated LPS-induced systemic inflammation in mice



Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice were intraperitoneally injected with either normal saline (Ctrl) or LPS (10 mg/kg) for 12 h. A, B: The representative images of LPS-induced histopathological alterations in liver tissue (A) and the corresponding liver histology score (B) (HE, scale bar=100 μm). C-E: Measurement of serum AST (C), ALT (D), and ALP (E) levels in mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=6$).

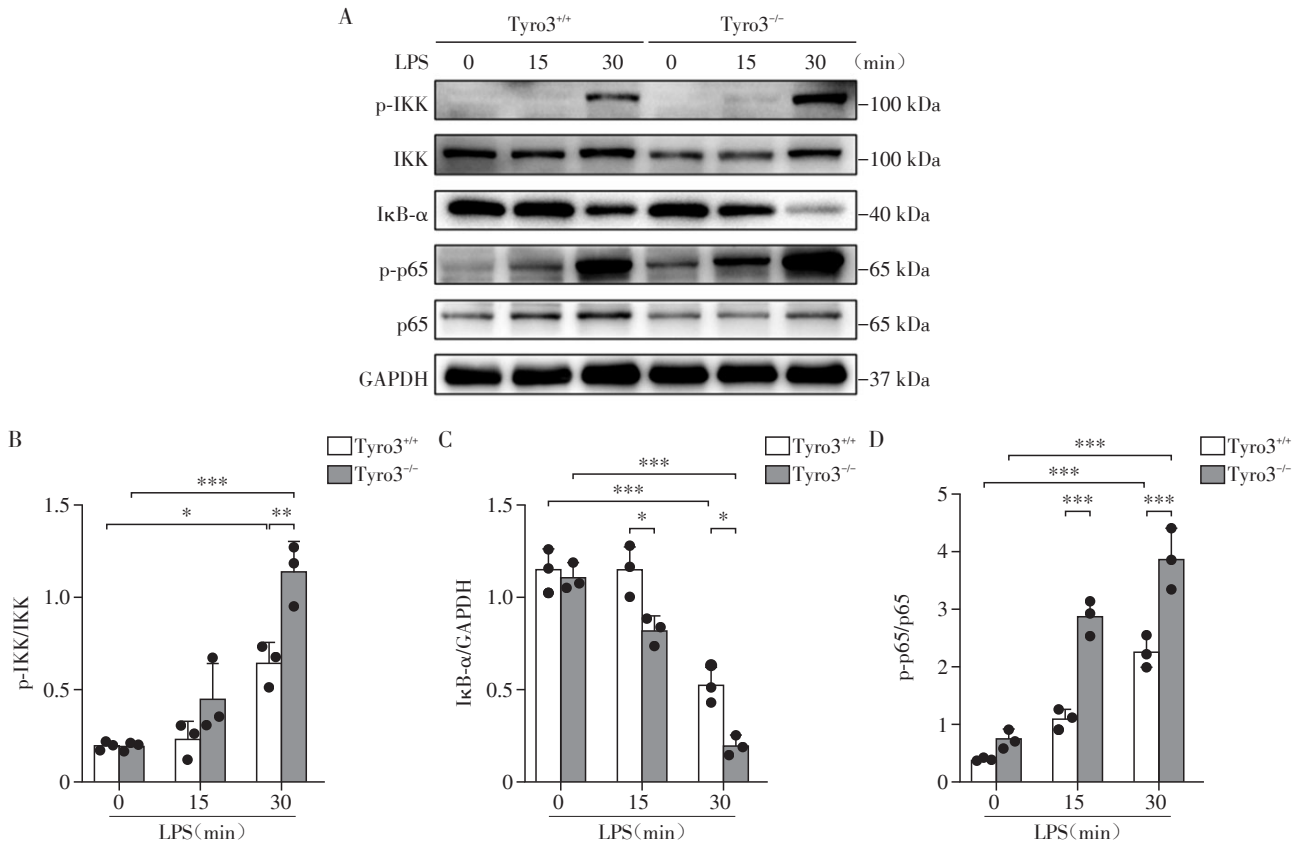
图4 Tyro3的缺失加重LPS诱导的小鼠急性肝损伤

Figure 4 Tyro3 deficiency exacerbated LPS-induced acute liver injury in mice

2.5 巨噬细胞 Tyro3 缺失增强 NF-κB 信号通路的激活

已知 NF-κB 通路在内毒素血症中具有重要的作用,而巨噬细胞是介导 NF-κB 信号通路激活的重要免疫细胞。为了探究巨噬细胞 Tyro3 对 NF-κB 通路的作用,提取 Tyro3^{+/+}和 Tyro3^{-/-}小鼠的 BMDM 后,用 LPS(100 ng/mL)刺激 0、15、30 min 后收取细胞蛋

白,Western blot 检测 NF-κB 通路 p-IKK、p-p65 的表达及 IκB-α 的降解情况,结果显示, Tyro3^{+/+}和 Tyro3^{-/-} BMDM 在 LPS 刺激后 IKK、p65 蛋白的磷酸化均显著增强, IκB-α 的降解加速, Tyro3^{-/-} BMDM 中 LPS 诱导的 IKK、p65 蛋白的磷酸化更显著(图 5),说明 Tyro3 的缺失可以增强 NF-κB 通路活化。



BMDM from Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice were stimulated with LPS (100 ng/mL) for 0, 15, and 30 min. A-D: Western blot was used to detect the activation of the NF-κB pathway, including p-IKK, IκB-α and p-p65. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 (n=3).

图5 巨噬细胞 Tyro3 通过减弱 NF-κB 信号通路减轻炎症

Figure 5 Macrophage Tyro3 alleviated inflammation by attenuating the NF-κB signaling pathway

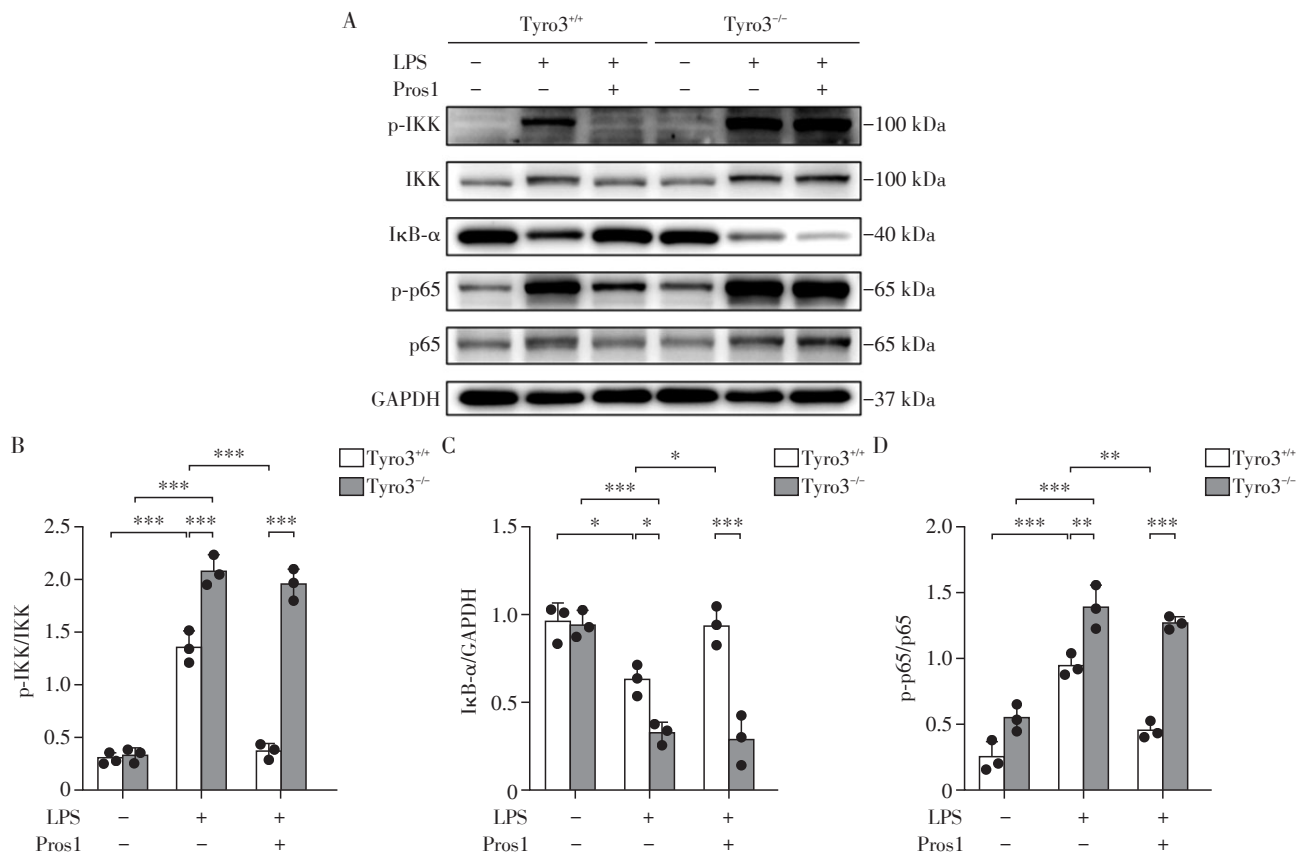
2.6 Pros1 可以部分恢复 LPS 诱导的 NF-κB 信号通路的激活

Pros1 是 Tyro3 的内源性配体,为了探究激活 Tyro3 是否可以部分挽救 LPS 诱导的 NF-κB 通路的激活,在提取 Tyro3^{+/+}和 Tyro3^{-/-}小鼠 BMDM 后,使用 LPS(100 ng/mL)或与 Pros1(20 ng/mL)共同刺激 30 min,收取细胞蛋白。Western blot 结果显示 Pros1 可以显著抑制 LPS 诱导的 NF-κB 通路中 p-IKK、p-p65 的激活,抑制 IκB-α 的降解,而在 Tyro3 缺失的 BMDM 中这一效应消失(图 6)。

3 讨论

脓毒症是一种由感染引发的全身性炎症反应

综合征,其病理特征主要表现为机体免疫调节失衡和炎症介质过度释放。当病原体侵入人体后,免疫系统出现异常激活,导致促炎因子和抗炎因子比例失调,这种失控的免疫应答可能引发多器官功能障碍,严重时可危及生命^[12-13]。目前临床针对脓毒症的治疗仍面临重大挑战,其特异性治疗方案的开发尚处于关键研究阶段。尽管医学界在支持性治疗方面取得了一定进展,但针对该疾病核心病理生理机制的靶向干预策略仍需进一步探索和完善。内毒素血症作为脓毒症发病的关键病理环节,在疾病进展中扮演着双重角色:既是重要的始动因素^[14],又可视为脓毒症的早期临床表型^[15-16]。现有研究表明,阐明内毒素血症的分子机制不仅有助于理解脓



BMDMs from Tyro3^{+/+} and Tyro3^{-/-} mice were stimulated with LPS (100 ng/mL), or co-stimulated with Pros1 (20 ng/mL) for 0 and 30 min. A-D: Western blot was used to detect the activation of the NF-κB pathway, including p-IKK, IκB-α and p-p65. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 (*n*=3).

图6 Pros1可以部分恢复LPS诱导的NF-κB信号通路的激活

Figure 6 Pros1 partially restored the activation of the NF-κB signaling pathway induced by LPS

毒症的发病过程,更能为开发新型靶向治疗策略提供重要理论依据。

受体酪氨酸激酶TAM(Tyro3、Axl、Mertk)家族成员参与多种病理生理过程,包括炎症调节、血小板聚集、平滑肌稳态、胞葬作用调节及细胞的增殖、存活、黏附和迁移等^[17-19],Tyro3作为TAM家族中的重要一员,在多系统多疾病中具有重要的作用^[20-21],其在多种恶性肿瘤中表达升高,介导关键的致癌途径PI3K-AKT和STAT信号转导,下调该基因的表达或阻断其激酶活性可以抑制癌症的进展^[22];Pros1作为Tyro3的内源性配体,可能通过激活AKT通路抑制足细胞的凋亡及炎症反应,从而在糖尿病肾病中起保护作用^[23];巨噬细胞SR-A1促进Tyro3介导的胞葬作用,抑制炎症并缓解主动脉夹层的发生发展^[24]。已有研究表明,Tyro3的另一配体Gas6通过阻断Axl介导的NF-κB信号通路,减弱LPS诱导的血管内皮细胞血管内皮高通透性^[25],然而,Tyro3在脓毒症病理过程中的调控作用仍不清楚。本研

究首先通过GEO数据库(GSE54514)分析脓毒症患者外周血中Tyro3的表达谱,发现Tyro3的表达在患者中显著降低,这提示Tyro3可能在脓毒症中存在一定的作用。

肝损伤是脓症患者多器官功能障碍和高死亡率的独立危险因素,过度的炎症反应在脓毒症相关急性肝损伤的发展中起着重要作用^[26]。肝脏中的巨噬细胞是先天免疫的第一道防线,其激活是脓毒症肝损伤的始动因素^[27],既往研究表明,巨噬细胞在脓毒症期间被募集并释放大量促炎细胞因子和趋化因子,导致细胞因子风暴并促进其他器官发生功能障碍^[28]。Tyro3通过抑制铁死亡和肿瘤上皮-间充质分化,诱导抗PD-1/PD-L1耐药性,在肿瘤免疫中起着重要作用^[29]。尽管Tyro3可以促进肿瘤中的免疫逃逸,但其在调控先天免疫方面的作用也不容小觑,其在树突状细胞中通过调控抗原提呈,间接抑制辅助性T细胞2(T helper 2, Th2)细胞分化,限制2型免疫反应,抗过敏的同时

抑制抗寄生虫免疫反应^[30]; Tyro3被配体 Pros1 激活后可通过减少 p38 α 的磷酸化及 p38 γ 与 c-Jun 的结合来抑制小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞活化^[31]; Gas6 和 ProS1 可以与凋亡细胞表面暴露的磷脂酰丝氨酸结合,形成桥接分子,从而激活 Tyro3,促进巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬,维持组织稳态^[32];然而, Tyro3 如何调节脓毒症中的先天免疫还未见报道。

NF- κ B 信号通路是巨噬细胞内一个关键的转录调控通路,广泛参与炎症反应、免疫应答、细胞存活和凋亡等过程。在急性脓毒症病理进程中, NF- κ B 信号通路被过度激活, LPS 与宿主细胞表面 TLR4 结合后,启动一系列级联反应,激活下游的 MyD88 依赖性信号通路^[33]。因此,抑制 NF- κ B 信号通路的激活可能成为调节炎症反应的关键节点。Tyro3 仅在慢性肾小球疾病中被报道可以通过抑制 NF- κ B 信号通路来抑制足细胞炎症^[23],在急性炎症中尚未见报道,本研究提取了野生和 Tyro3^{-/-}小鼠的 BMDM,使用 LPS 诱导巨噬细胞炎症,以激活巨噬细胞 NF- κ B 通路,探究 Tyro3 在急性炎症中是否对巨噬细胞 NF- κ B 通路具有调节作用。结果显示, Tyro3 的缺失可以加强巨噬细胞中 NF- κ B 通路的激活;同时,在使用 Tyro3 激动剂 Pros1 后, Tyro3^{+/+}巨噬细胞 NF- κ B 通路被显著抑制,而这种抑制作用在 Tyro3^{-/-}巨噬细胞中不明显。以上结果表明, Tyro3 可能通过抑制 NF- κ B 通路的激活从而在脓毒症中发挥抗炎作用,保护脏器免受炎症风暴。

本研究尚存在一定的局限性,包括未在体探究 Pros1 是否对小鼠脓毒症有治疗作用,未提取小鼠肝脏巨噬细胞进行实验,同时 Tyro3 对 NF- κ B 通路的具体调控作用分子机制仍有待进一步探讨。

综上所述,本研究首次揭示了 Tyro3 蛋白酪氨酸激酶在脓毒症中的保护性作用机制。实验结果表明, Tyro3 能够显著减轻脓毒症诱导的小鼠急性炎症反应和肝脏损伤,其分子机制可能与调控巨噬细胞 NF- κ B 通路的活化有关。这一发现为脓毒症的靶向治疗提供了新的潜在干预靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

The authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明:

陈琪、李晓宇负责课题设计、提供研究资金支持、论文审阅与修订;汪洁、方瑞琪、杨青、柏惠负责实验内容和数据分析;汪洁、李猛负责文章的撰写。

Author's Contributions:

CHEN Qi and LI Xiaoyu were responsible for supervision, funding acquisition, writing, reviewing and revising the manuscript. WANG Jie, FANG Ruiqi, YANG Qing, and BAI Hui were responsible for methodology, investigation, data curation, and analysis. WANG Jie and LI Meng were responsible for writing and revising the manuscript.

[参考文献]

- [1] MAKI D G. Link between compliance with, or implementation of, the SEP-1 sepsis bundle and mortality is mixed (low-level evidence)[J]. *Ann Intern Med*, 2025, 178(6): JC70
- [2] FLEISCHMANN-STRUZEK C, MELLHAMMAR L, ROSE N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(8): 1552-1562
- [3] WANG D, WANG X, MU J S, et al. Prognostic indicators and outcome in patients with acute liver failure, sepsis and with and without shock: a retrospective cohort study[J]. *Ann Med*, 2025, 57(1): 2438833
- [4] HU J J, DENG F, SUN Q S, et al. Time-restricted feeding protects against septic liver injury by reshaping gut microbiota and metabolite 3-hydroxybutyrate[J]. *Gut Microbes*, 2025, 17(1): 2486515
- [5] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, 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
- [6] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like receptors and the control of immunity[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-1066
- [7] ZHANG L, LI J, FENG M Q, et al. Tigecycline modulates LPS-induced inflammatory response in sepsis via NF- κ B signalling pathways: experimental insights into immune regulation[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2025, 66(1): 107496
- [8] YIN W Y, XUE H, ZHANG Y Q, et al. Steroid constituents of *Solidago canadensis* alleviate LPS-induced inflammation via AMPK regulated mitophagy/NLRP3 and NF- κ B pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 998: 177512
- [9] WENG D L, SHI W, HU Y, et al. Neutralization of IL-33 ameliorates septic myocardial injury through anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-apoptotic by regulating the NF- κ B/STAT3/SOCS3 signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 237: 116954
- [10] MIAO Y R, RANKIN E B, GIACCIA A J. Therapeutic tar-

- geting of the functionally elusive TAM receptor family[J]. Nat Rev Drug Discov, 2024, 23(3): 201-217
- [11] DERYCKERE D, HUELSE J M, EARP H S, et al. TAM family kinases as therapeutic targets at the interface of cancer and immunity[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(11): 755-779
- [12] GUARINO M, PERNA B, CESARO A E, et al. 2023 update on sepsis and septic shock in adult patients: management in the emergency department [J]. J Clin Med, 2023, 12(9): 3188
- [13] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic shock[J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75-87
- [14] PAROLINI C. Sepsis and high - density lipoproteins: pathophysiology and potential new therapeutic targets[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871(5): 167761
- [15] TAN Y, OUYANG Y, XIAO L S, et al. Lipopolysaccharide-induced DNA damage response activates DNA -PKcs to drive actin cytoskeleton disruption and cardiac microvascular dysfunction in endotoxemia[J]. Theranostics, 2025, 15(12): 5969-5997
- [16] PARANTAINEN J, BARRETO G, STRANDBERG T E, et al. Increased intestinal mucosal permeability and metabolic endotoxemia predict the risk of cardiovascular mortality[J]. Atherosclerosis, 2025, 405: 119220
- [17] CHEN F F, LI Y X, ZHAO L, et al. Anti-inflammatory effects of MerTK by inducing M2 macrophage polarization *via* PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in gout[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142(Pt A): 112942
- [18] QUARATO E R, SALAMA N A, LI A J, et al. Efferocytosis by bone marrow mesenchymal stromal cells disrupts osteoblastic differentiation *via* mitochondrial remodeling [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 428
- [19] PROUSE T, MAJUMDER S, MAJUMDER R. Functions of TAM receptors and ligands protein S and Gas6 in atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23): 12736
- [20] YE K, WANG P C, CHEN Y X, et al. E3 ubiquitin ligase BTBD3 inhibits tumorigenesis of colorectal cancer by regulating the TYRO3/Wnt/ β -catenin signaling axis[J]. Cancer Cell Int, 2024, 24(1): 306
- [21] GAO L, HE C, YANG A Z, et al. Receptor tyrosine kinases Tyro3, Axl, and Mertk differentially contribute to antibody-induced arthritis[J]. Cell Commun Signal, 2023, 21(1): 195
- [22] ZHONG F, CAI H, FU J, et al. TYRO3 agonist as therapy for glomerular disease [J]. JCI Insight, 2023, 8(1): e165207
- [23] PARK M, KIM J W, KIM K M, et al. Circulating small extracellular vesicles activate TYRO3 to drive cancer metastasis and chemoresistance[J]. Cancer Res, 2021, 81(13): 3539-3553
- [24] ZHANG Z, JIANG Y L, ZHOU Z Q, et al. Scavenger receptor A1 attenuates aortic dissection *via* promoting efferocytosis in macrophages [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 168: 392-403
- [25] NI J J, LIN M T, JIN Y J, et al. Gas6 attenuates sepsis-induced tight junction injury and vascular endothelial hyperpermeability *via* the axl/NF- κ B signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 662
- [26] 弓玉祥,倪维杰,倪海锋. 活性维生素D3对脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(9): 1289-1295
- GONG Y X, NI W J, NI H F, et al. Protective effects and mechanism of vitamin D3 against lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice[J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2021, 41(9): 1289-1295
- [27] LI J, XUAN M J, YANG L, et al. Comprehensive single-cell analysis deciphered the immunoregulatory mechanism of TPPU in alleviating sepsis-related acute liver injury[J]. J Adv Res, 2025, 71: 457-470
- [28] YUAN G, QIAO Q D, JIANG A L, et al. LPS-induced extracellular AREG triggers macrophage pyroptosis through the EGFR/TLR4 signaling pathway [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1549749
- [29] JIANG Z, LIM S O, YAN M S, et al. TYRO3 induces anti -PD-1/PD-L1 therapy resistance by limiting innate immunity and tumoral ferroptosis[J]. J Clin Invest, 2021, 131(8): e139434
- [30] CHAN P Y, CARRERA SILVA E A, DE KOUCHEVSKY D, et al. The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity [J]. Science, 2016, 352(6281): 99-103
- [31] UBIL E, CASKEY L, HOLTZHAUSEN A, et al. Tumor-secreted Pros1 inhibits macrophage M1 polarization to reduce antitumor immune response [J]. J Clin Invest, 2018, 128(6): 2356-2369
- [32] PENG Y H, LI M C, YEN W C, et al. Structure-based design of potent and selective MerTK inhibitors by modulating the conformation of α C helix[J]. J Med Chem, 2025, 68(11): 10877-10896
- [33] KHAN A, ZHANG Y, MA N N, et al. NF- κ B role on tumor proliferation, migration, invasion and immune escape [J]. Cancer Gene Ther, 2024, 31(11): 1599-1610

[收稿日期] 2025-05-29

(本文编辑:蒋 莉)