

• 论 著 •

IRAK4 通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路对创伤性脑损伤后神经元铁死亡的作用研究^{*}

余 坤, 李秀山, 莫荣波, 胡焕科, 赵文杰[△]

河北工程大学附属医院神经外科, 河北邯郸 056001

摘要:目的 探讨白细胞介素-1 受体相关激酶 4 (IRAK4) 在创伤性脑损伤 (TBI) 中的作用及其机制。方法 采用可控性皮层撞击法 (CCI) 构建中度 TBI 损伤模型。实验 1: 将 30 只小鼠随机分为 sham 组和 CCI 12 h、CCI 1 d、CCI 2 d、CCI 3 d 和 CCI 7 d 组, 各 5 只。实验 2: 将 40 只小鼠随机分为 sham 组、CCI 组、si-IRAK4 组和 si-IRAK4+ML385 组, 各 10 只。Western blot 检测脑组织 IRAK4 时间梯度表达及铁死亡和核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素氧合酶-1 (HO-1) 通路相关蛋白表达, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测脑组织 IRAK4 mRNA 表达, 免疫荧光共染检测 IRAK4 细胞定位, 改良神经功能缺损评分 (mNSS) 评估神经功能, 试剂盒检测脂质过氧化和铁蓄积水平, 透射电子显微镜检测神经元线粒体损伤。结果 CCI 后 12 h 开始, 小鼠脑组织中 IRAK4 mRNA 和蛋白水平较 sham 组增加 ($P < 0.05$), 在 1 d 达到峰值。与 sham 组相比, CCI 组小鼠脑组织损伤部位 IRAK4+NeuN+ 细胞占比增多 ($P < 0.05$), 1、3、5 和 7 d 的 mNSS 评分、湿干重比及白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 水平升高 ($P < 0.05$), Fe²⁺ 和丙二醛 (MDA) 水平增多 ($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶 (SOD) 水平降低 ($P < 0.05$), 神经元线粒体嵴减少, 线粒体外膜断裂, 膜密度增加, GPX4 表达降低, Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达升高 ($P < 0.05$), 而 IRAK4+GFAP+ 和 IRAK4+Iba1+ 细胞占比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 CCI 组比较, si-IRAK4 组 si-IRAK4 组小鼠造模后各时间点的 mNSS 评分、湿干重比及 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均降低 ($P < 0.05$), Fe²⁺ 和 MDA 水平减少 ($P < 0.05$), SOD 水平增多 ($P < 0.05$), 脑组织神经元线粒体的形态学特征明显改善, GPX4 表达升高 ($P < 0.05$), Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达降低 ($P < 0.05$)。与 si-IRAK4 组相比, si-IRAK4+ML385 组小鼠造模后各时间点的 mNSS 评分、湿干重比及 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高 ($P < 0.05$), Fe²⁺ 和 MDA 水平增多 ($P < 0.05$), SOD 水平降低 ($P < 0.05$), 脑组织神经元线粒体损伤进一步恶化, GPX4 表达降低 ($P < 0.05$), Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达升高 ($P < 0.05$)。结论 IRAK4 在 TBI 后脑组织中高表达, 敲低 IRAK4 可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路, 抑制炎症和氧化应激, 从而改善神经元铁死亡。

关键词: 白细胞介素-1 受体相关激酶 4; 创伤性脑损伤; 氧化应激; 铁死亡; 核因子 E2 相关因子 2/ 血红素氧合酶-1 通路

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2026.01.012

中图法分类号: R651.1

文章编号: 1673-4130(2026)01-0065-08

文献标志码: A

Effect of IRAK4 on neuronal ferroptosis after traumatic brain injury by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway^{*}

SHE Kun, LI Xiushan, MO Rongbo, HU Huanke, ZHAO Wenjie[△]

Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056001, China

Abstract: **Objective** To investigate the role and mechanism of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) in traumatic brain injury (TBI). **Methods** A moderate traumatic brain injury (TBI) model was established using the controlled cortical impact method (CCI). In Experiment 1, thirty mice were randomly assigned to either the sham group CCI 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, and 7 d groups, with five mice in each group. In Experiment 2, forty mice were randomly allocated into four groups: sham group, CCI group, si-IRAK4 group, and si-IRAK4+ML385 group, with ten mice per group. Western blot analysis was employed to investigate the time-dependent expression of IRAK4 as well as the expression levels of proteins related to ferroptosis and the Nrf2/

^{*} 基金项目: 河北省医学科学研究课题 (20240044)。

作者简介: 余坤, 男, 主治医师, 主要从事颅脑损伤及脑血管疾病诊治方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 108609000@qq.com。

HO-1 signaling pathway in brain tissue. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was utilized to measure the mRNA expression of IRAK4 in brain tissue. Immunofluorescence co-staining was performed to determine the cellular localization of IRAK4. Neurological function was assessed using the modified neurological severity score (mNSS). Lipid peroxidation and iron accumulation levels were quantified using commercially available kits, and neuronal mitochondrial damage was evaluated via transmission electron microscopy.

Results Starting from 12 hours after CCI, the levels of IRAK4 mRNA and protein in mouse brain tissue increased compared to the sham group ($P < 0.05$), reaching their peak at day 1. Additionally, the proportion of IRAK4+NeuN+ cells at the injury site in the brain tissue of the CCI group was significantly elevated ($P < 0.05$). The mNSS scores, wet/dry weight ratios, as well as the levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α at 1, 3, 5, and 7 days post-CCI were markedly increased ($P < 0.05$). Furthermore, Fe^{2+} and malondialdehyde (MDA) levels were elevated ($P < 0.05$), while superoxide dismutase (SOD) level was reduced ($P < 0.05$). Neuronal mitochondrial cristae were decreased, the mitochondrial outer membrane was disrupted, and membrane density was increased ($P < 0.05$). GPX4 expression was decreased, whereas Nrf2 nuclear translocation and the expressions of HO-1 and ACSL4 were significantly increased ($P < 0.05$). However, no significant differences were observed in the proportions of IRAK4+GFAP+ cells and IRAK4+Iba1+ cells between the two groups ($P > 0.05$). Compared with the CCI group, the mNSS score, wet dry weight ratio, IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels of si-IRAK4 group mice at various time points after modeling were all reduced ($P < 0.05$), Fe^{2+} and MDA levels were reduced ($P < 0.05$), SOD levels were increased ($P < 0.05$), and the morphological characteristics of neuronal mitochondria in brain tissue were significantly improved. GPX4 expression increased ($P < 0.05$), Nrf2 nuclear translocation and HO-1, ACSL4 expression decreased ($P < 0.05$). Compared with the si-IRAK4 group, the mNSS score, wet dry weight ratio, IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels of mice in the si-IRAK4+ML385 group increased at all time points after modeling ($P < 0.05$), while Fe^{2+} and MDA levels increased ($P < 0.05$), SOD levels decreased ($P < 0.05$), mitochondrial damage to brain tissue neurons worsened, GPX4 expression decreased ($P < 0.05$), Nrf2 nuclear translocation and HO-1, ACSL4 expression increased ($P < 0.05$).

Conclusion IRAK4 is highly expressed in the brain tissue after TBI. Knock-down of IRAK4 may inhibit inflammation and oxidative stress by activating the Nrf2 / HO-1 pathway, thereby improving neuronal ferroptosis.

Key words: interleukin-1 receptor-associated kinase 4; traumatic brain injury; oxidative stress; ferroptosis; nuclear factor E2 related factor 2/heme oxygenase-1 pathway

创伤性脑损伤(TBI)是全球范围内致残与致死的主要病因之一,其病理机制涉及原发性机械损伤和继发性损伤级联反应,如神经炎症、氧化应激和程序性细胞死亡^[1]。近年来,铁死亡作为一种铁依赖性脂质过氧化驱动的非凋亡性细胞死亡形式,在TBI后继发性神经元损伤中的作用逐渐受到关注^[2]。有研究表明,TBI后脑内游离铁蓄积、GPX4活性抑制及脂质过氧化产物增加,表明铁死亡可能是神经元进行性丢失的关键机制^[3]。然而,铁死亡在TBI中的上游调控网络尚未完全阐明,尤其是炎症信号与抗氧化防御系统的交互作用仍需深入探索。白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK4)作为Toll样受体(TLR)/白细胞介素(IL)-1R信号通路的核心分子,在神经炎症中扮演重要角色^[4]。TBI后小胶质细胞中IRAK4通过激活TAK1信号通路,驱动促炎因子释放,促进活性氧(ROS)生成,进而影响氧化还原稳态^[5-6]。而核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)通路

是抗氧化应激的核心防御系统,通过调节铁代谢调节及脂质过氧化清除发挥保护作用^[7-8]。该通路的激活可减轻TBI后的氧化应激及炎症反应^[9]。然而,IRAK4是否通过调控Nrf2/HO-1通路介导TBI后神经元铁死亡鲜见报道。基于上述背景,本研究拟通过构建TBI小鼠模型,旨在阐明IRAK4/Nrf2/HO-1轴在TBI后铁死亡中的调控作用,为开发靶向IRAK4的神经保护策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 实验选用70只SPF级C57BL/6J雄性小鼠(10~12周龄,体重20~25g),购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0004。小鼠均饲养于SPF级屏障环境,具体条件为:12h昼夜节律循环,恒温(20±2)℃、恒湿(55±5)%环境控制,自由摄取标准饲料及灭菌饮用水。动物入室后经标准饲养条件下适应性饲养1周,随后开展实验。

1.2 主要实验试剂 ML385 购自美国 MedChemExpress 公司;丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和 Fe^{2+} 水平检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;IRAK4 抗体购自美国 Abcam 公司;GPX4、ACSL4、HO-1、Nrf2、 β -actin 或组蛋白 H3 抗体均购自美国 Affinity 公司。

1.3 方法

1.3.1 TBI 模型构建 参考文献[10]报道方法,采用可控性皮层撞击法(CCI)构建中度 TBI 损伤模型。异氟醚麻醉小鼠(3%用于诱导,1.5%用于维持,氧气以 0.5 L/min 的速度输送),并固定在立体定位装置上。行头皮正中矢状切口,颅骨上开孔(直径 4 mm)显露硬脑膜。该孔位于左前囟与后囟之间,其内侧缘距中线外侧 2 mm。移除骨瓣,将 3.0 mm 圆形撞击尖端连接到一个电磁控制的撞击装置,调整尖端垂直于硬脑膜。机器设置:速度 3.0 m/s,变形深度 2.0 mm,驻留时间 180 ms。

1.3.2 实验分组及处理 实验 1:将 30 只小鼠随机分为 sham 组和 CCI 12 h、CCI 1 d、CCI 2 d、CCI 3 d 和 CCI 7 d 组,各 5 只。CCI 组小鼠构建中度 TBI 损伤模型,sham 组小鼠除进行撞击外,其余处理相同。实验 2:将 40 只小鼠随机分为 sham 组、CCI 组、si-IRAK4 组和 si-IRAK4 + ML385 组,各 10 只。si-IRAK4 组和 si-IRAK4 + ML385 组小鼠分别用 5 μL Hamilton 注射器将 200 pmol/2 μL siRNA 以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率通过钻孔注入大鼠左脑室,之后 si-IRAK4 + ML385 组小鼠腹腔注射 Nrf2 抑制剂 ML385 (30 mg/kg)^[11]。

1.3.3 Western blot 检测脑组织 IRAK4 时间梯度表达及铁死亡和 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达 各组小鼠处理响应时间后取损伤脑组织,加入适量放射免疫沉淀裂解缓冲液裂提取总蛋白。随后通过二喹啉甲酸蛋白法测定试剂盒检测各样品浓度。在 10%~15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,孵育 IRAK4、GPX4、ACSL4、HO-1、Nrf2、 β -actin 或组蛋白 H3 一抗 4℃过夜。次日,用羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1 h 后,通过增强型化学发光检测系统检测蛋白印迹,并用 Image J 软件分析条带灰度值,以 β -actin 或组蛋白 H3 作为内参。

1.3.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测脑组织 IRAK4 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂从各组小鼠受损大脑皮质提取总 RNA。使用逆转录系统将总 RNA 逆转录为互补 DNA(cDNA)。使用 SYBR Green 试剂盒和适当的引物进行实时荧光 PCR。引物序列如下,IRAK4 上游引物:5'-CAAGTGATG-GAGATGACCTCTGCTTAG-3',下游引物:5'-TCT

AGCAATAACTGAGGTTTCACGGGTGTT-3'; GAPDH 上游引物:5'-GCAGTGGCAAAGTG-GAGATTG-3',下游引物:5'-TGCAGGATGCATT-GCTGACA-3'。采用标准 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法将 mRNA 表达水平以 GAPDH 为内参进行标准化处理。

1.3.5 免疫荧光共染检测 IRAK4 细胞定位 取小鼠脑组织,在 4%多聚甲醛中固定 24 h,常规石蜡包埋后行 4 μm 厚切片,4℃丙酮固定 10 min。室温下用含 0.5%曲拉通(Triton)X-100 的 5%山羊血清封闭 30 min,滴加 IRAK4 与神经元标志物 NeuN、星形胶质细胞标志物 GFAP 或小胶质细胞标志物 Iba1 一抗 4℃孵育过夜。次日,二抗室温孵育 1 h,二胺基苯基吡啶复染 2 h。荧光显微镜下获得图像并用 Image J 软件分析双阳性细胞数。

1.3.6 神经功能评分 采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估小鼠神经功能^[12]。所有的神经行为测试,包括运动、感觉、反射和平衡 4 个大项,每 1 个大项包含若干小项,最低 0 分,最高 18 分,分值越高则神经功能损伤越严重。

1.3.7 脑组织脂质过氧化和铁蓄积水平检测 使用市售的 MDA、GSH 和 Fe^{2+} 水平检测试剂盒,根据说明书实施操作,计算各组小鼠脑组织中 MDA、GSH 和 Fe^{2+} 水平。

1.3.8 透射电子显微镜检测神经元线粒体损伤 从病变边缘解剖脑样本,然后用磷酸盐缓冲戊二醛(2.5%)和四氧化锇(1%)进行后固定。切割脑样本,用 2%醋酸铀酰(UA)进行整体染色,在浓度梯度增加的丙酮溶液中脱水,并嵌入环氧树脂中。然后用柠檬酸铅和醋酸铀酰染色切片(70~90 nm),用透射电子显微镜拍摄超微结构图像。

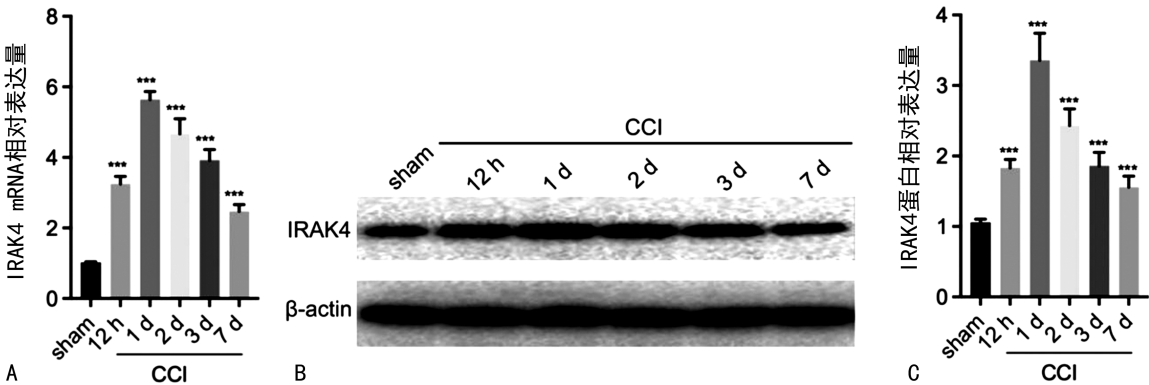
1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件进行数据统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCI 后不同时间点小鼠脑组织 IRAK4 的表达水平比较 与 sham 组相比,CCI 后 12 h 至 7 d 小鼠脑组织中 IRAK4 的 mRNA 和蛋白水平均表达增加,在 CCI 后 1 d 达到峰值,之后略有下降,但仍然高于 sham 组($P < 0.05$)。因此,后续实验选择 CCI 后 1 d 作为研究时间点。见图 1。

2.2 CCI 后 IRAK4 在受损脑组织中的细胞定位分析 免疫荧光共染评估 IRAK4 与神经元标志物 NeuN、星形胶质细胞标志物 GFAP 和小胶质细胞标志物 Iba1 的分布。结果显示,与 sham 组相比,CCI 组小鼠脑组织损伤部位 IRAK4 + NeuN + 细胞占比增多($P < 0.05$),而 IRAK4 + GFAP + 和 IRAK4 + Iba1 +

细胞占比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2、表 1。



注:A 为 qPCR;B 为 Western blot;C 为蛋白相对表达量统计图;与 sham 组相比,*** $P<0.001$ 。
图 1 CCI 后不同时间点小鼠脑组织 IRAK4 表达水平比较

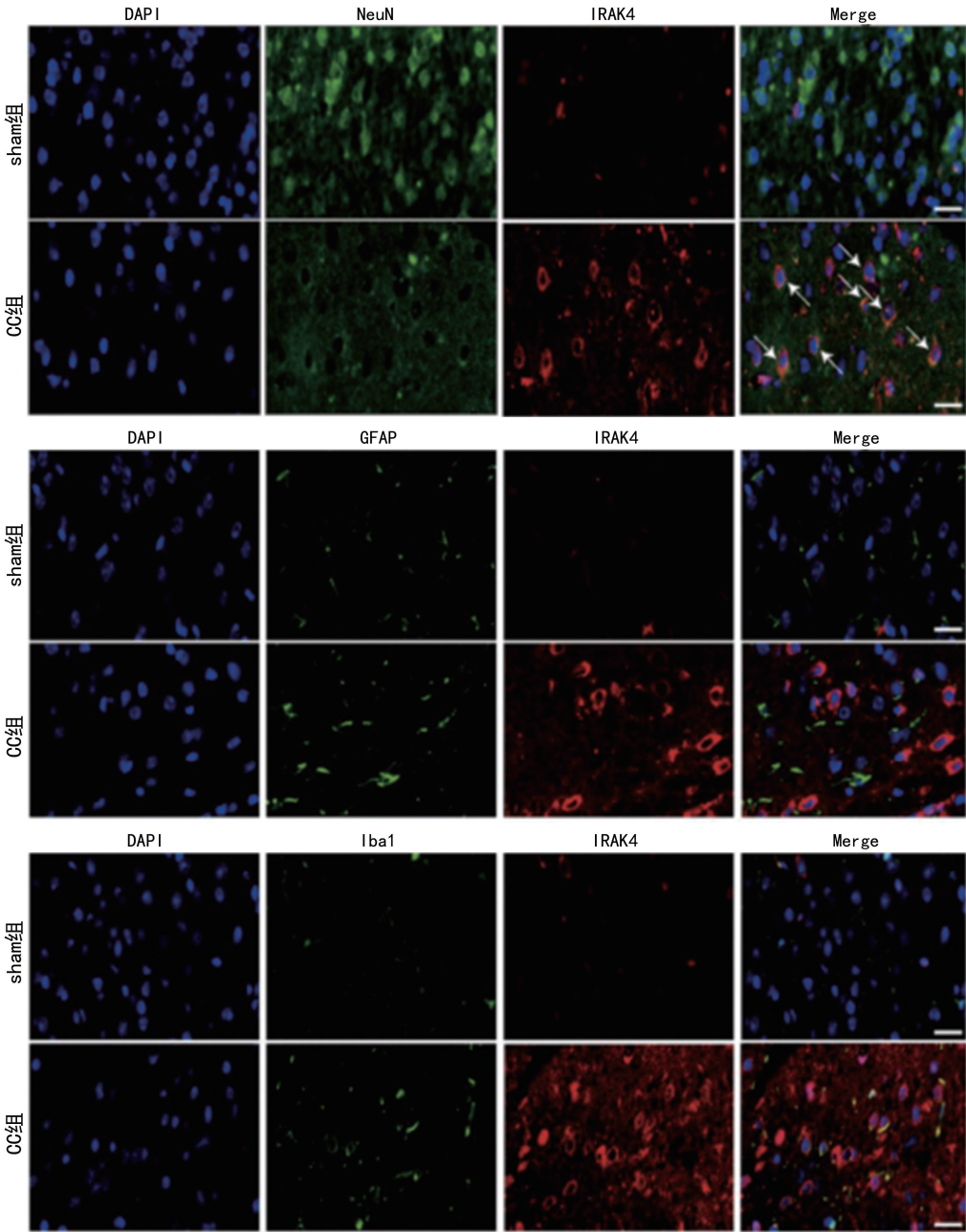


图 2 免疫荧光共染检测受损脑组织中 IRAK4 细胞定位

表 1 受损脑组织中 IRAK4 细胞定位比较($\bar{x}\pm s, \%$)			
组别	IRAK4+ NeuN+细胞	IRAK4+ GFAP+细胞	IRAK4+ Iba1+细胞
sham 组	3.67±0.31	3.56±0.62	3.91±1.03
CCI 组	38.94±6.84 [*]	3.88±0.79	4.27±1.22

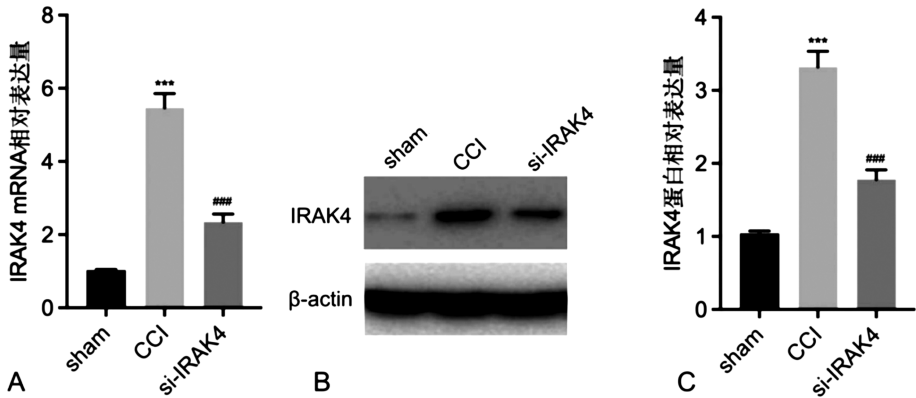
注:与 sham 组相比, ^{*} $P<0.001$ 。

2.3 si-IRAK4 敲低效率验证 与 sham 组相比,CCI 组小鼠脑组织 IRAK4 的 mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与 CCI 组比较,si-IRAK4 组小鼠脑组织 IRAK4 的 mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.05$)。见图 3。

2.4 敲低 IRAK4 可改善 CCI 后神经功能 与 sham

组相比,CCI 组小鼠造模后 1、3、5、7 d 的 mNSS 评分均升高($P<0.05$)。与 CCI 组比较,si-IRAK4 组小鼠造模后各时间点的 mNSS 评分均降低($P<0.05$)。与 si-IRAK4 组相比,si-IRAK4+ML385 组小鼠造模后各时间点的 mNSS 评分均升高($P<0.05$)。见表 2。

2.5 敲低 IRAK4 可减轻 CCI 后脑水肿和神经炎症 与 sham 组相比,CCI 组小鼠脑组织湿干重比及 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$)。与 CCI 组比较,si-IRAK4 组小鼠脑组织湿干重比及 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$)。与 si-IRAK4 组相比,si-IRAK4+ML385 组小鼠脑组织湿干重比及 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$)。见表 3。



注:A 为 qPCR;B 为 Western blot;C 为蛋白相对表达量统计图;与 sham 组相比, ^{***} $P<0.001$;与 CCI 组相比, ^{###} $P<0.001$ 。

图 3 IRAK4 敲低效率验证

表 2 各组小鼠不同时间点 mNSS 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)				
组别	造模后 1 d	造模后 3 d	造模后 5 d	造模后 7 d
sham 组	0.76±0.11	0.64±0.13	0.57±0.10	0.52±0.12
CCI 组	15.67±3.32 [*]	18.38±4.67 [*]	13.11±3.34 [*]	10.38±4.39 [*]
si-IRAK4 组	7.23±2.11 [#]	9.36±4.36 [#]	7.21±3.77 [#]	5.13±1.67 [#]
si-IRAK4+ML385 组	13.27±3.77 ^{&}	16.35±4.45 ^{&}	12.38±2.78 ^{&}	8.36±4.85 ^{&}

注:与 sham 组相比, ^{*} $P<0.001$;与 CCI 组相比, [#] $P<0.01$;与 si-IRAK4 组相比, [&] $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠脑组织湿干重比和炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	湿干重比	IL-6(pg/mg)	IL-1 β (pg/mg)	TNF- α (pg/mg)
sham 组	76.12±1.68	7.37±0.68	23.16±6.22	4.36±0.55
CCI 组	82.69±2.73 [*]	127.36±14.36 [*]	207.38±23.14 [*]	121.36±16.29 [*]
si-IRAK4 组	77.36±2.53 [#]	53.76±6.83 [#]	82.36±9.23 [#]	38.77±6.27 [#]
si-IRAK4+ML385 组	83.24±1.97 ^{&}	119.25±17.35 ^{&}	194.37±15.46 ^{&}	117.36±8.25 ^{&}

注:与 sham 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 CCI 组相比, [#] $P<0.05$;与 si-IRAK4 组相比, [&] $P<0.05$ 。

2.6 敲低 IRAK4 可减轻 CCI 后脂质过氧化和铁蓄积 与 sham 组相比,CCI 组小鼠脑组织中 Fe²⁺ 和 MDA 水平升高($P<0.05$),SOD 水平降低($P<0.05$)。与 CCI 组比较,si-IRAK4 组小鼠脑组织中 Fe²⁺ 和 MDA 水平降低($P<0.05$),SOD 水平升高

($P<0.05$)。与 si-IRAK4 组相比,si-IRAK4+ML385 组小鼠脑组织中 Fe²⁺ 和 MDA 水平升高($P<0.05$),SOD 水平降低($P<0.05$)。见表 4。

2.7 敲低 IRAK4 可减轻 CCI 后神经元线粒体损伤 sham 组神经元线粒体呈典型椭圆形态,可见完

整双层膜结构和排列紧密的线粒体嵴。相较于 sham 组, CCI 组神经元线粒体出现显著病理改变, 表现为嵴结构稀疏、外膜连续性中断及基质密度异常增高。与 CCI 组比较, si-IRAK4 组小鼠脑组织神经元线粒体嵴密度和膜完整性得到明显改善。值得注意的是, 联合应用 Nrf2 抑制剂 ML385 可逆转 si-IRAK4 的保护效应, 导致线粒体结构损伤加重, 见图 4。

2.8 敲低 IRAK4 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路调控 CCI 小鼠神经元铁死亡 与 sham 组相比, CCI 组小鼠脑组织中 GPX4 表达降低 ($P<0.05$), Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达升高 ($P<0.05$)。与 CCI 组比较, si-IRAK4 组小鼠脑组织中 GPX4 表达升高 ($P<0.05$), Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达降低 ($P<0.05$)。与 si-IRAK4 组相比, si-IRAK4 +

ML385 组小鼠脑组织中 GPX4 表达降低 ($P<0.05$), Nrf2 核转位及 HO-1、ACSL4 表达升高 ($P<0.05$)。见图 5。

表 4 各组小鼠脑组织铁蓄积和脂质过氧化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Fe ²⁺ ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
sham 组	0.07 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.06	77.35 $\pm$ 5.28
CCI 组	0.34 $\pm$ 0.06 [*]	0.78 $\pm$ 0.07 [*]	60.22 $\pm$ 3.27 [*]
si-IRAK4 组	0.14 $\pm$ 0.03 [#]	0.63 $\pm$ 0.05 [#]	73.36 $\pm$ 5.11 [#]
si-IRAK4+ML385 组	0.33 $\pm$ 0.07 ^{&}	0.75 $\pm$ 0.06 ^{&}	64.28 $\pm$ 2.36 ^{&}

注: 与 sham 组相比, ^{*} $P<0.001$; 与 CCI 组相比, [#] $P<0.05$; 与 si-IRAK4 组相比, [&] $P<0.05$ 。

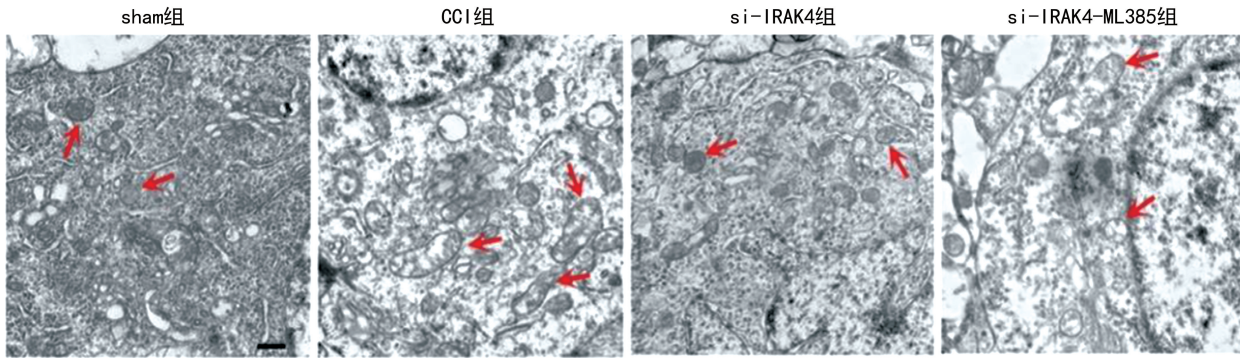
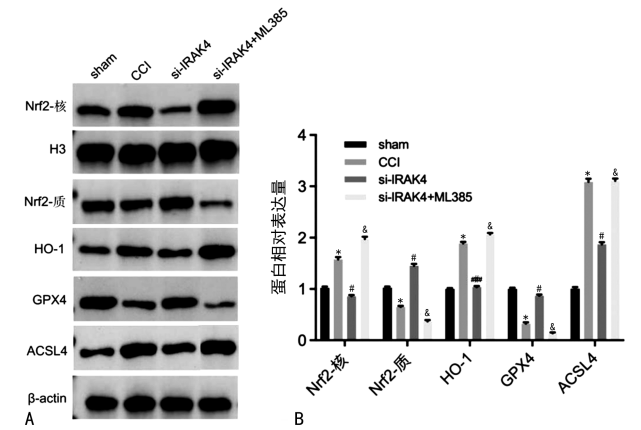


图 4 透射电子显微镜检测各组小鼠神经元线粒体超微结构 ($\times 20\,000$)



注: A 为 Western blot; B 为蛋白相对表达量统计图; 与 sham 组相比, ^{*} $P<0.05$; 与 CCI 组相比, [#] $P<0.05$; 与 si-IRAK4 组相比, [&] $P<0.05$ 。

图 5 CCI 后神经元铁死亡和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达比较

3 讨 论

脑外伤是一个日益严重的公共卫生挑战, 全球每年约有 5 000 多万人患有脑外伤^[13]。TBI 导致所有外伤相关死亡的 30%~40%, 高达 60% 的患者有严重的身体、精神和社会缺陷^[1]。然而, TBI 的病理机

制尚不清楚。继发性 TBI 的药物治疗是一个新的研究趋势, 一些有前景的小分子化合物, 如钙通道拮抗剂、类固醇激素、环孢素、孕酮和他汀类药物, 具有潜在的神经保护作用。遗憾的是, 这些化合物均未进入临床试验^[1]。因此, 寻找新的治疗 TBI 的药物靶点具有相当大的潜在临床价值。

IRAK4 信号通路的病理性激活与多种自身免疫性和炎症性疾病密切相关, 其病理生理学重要性已在 IRAK4 基因敲除小鼠模型中得以揭示。例如, IRAK4 敲除小鼠对 LPS 诱导的内毒素休克及 TLR9 激动剂 CpG DNA 联合 D-半乳糖胺诱导的肝损伤表现出完全耐受性^[14]; 与野生型小鼠相比, IRAK4 敲除小鼠在上述刺激下产生的细胞因子水平显著降低^[14], 这表明 IRAK4 可能成为改善先天免疫相关疾病的重要分子靶点。此外, IRAK4 激活也被发现在多种中枢神经系统损伤中发挥关键作用, ZHAO 等^[15]发现, 抑制 IRAK4/NF- κ B/NLRP3 信号通路可减少癫痫大鼠海马神经元焦亡, 减少癫痫发作。FANG 等通过构建大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型, 揭示 microRNA-544 可通过特异性结合 IRAK4 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)抑制其表达, 最终显著减轻脑缺血再灌注损

伤后的神经炎症反应^[16]。与这些研究结果一致,本文发现 TBI 后 IRAK4 激活。此外,本文发现抑制 IRAK4 表达能显著减轻 CCI 诱导的神经炎症和脑水肿,并改善神经功能,提示靶向抑制 IRAK4 信号通路在治疗 TBI 中具有潜力。

铁死亡是近年来新发现的一种新型非凋亡细胞死亡形式,其特征是谷胱甘肽耗竭,导致 GPX4 活性降低,阻止脂质过氧化物的代谢^[2]。此外,铁死亡的另一个重要特征是铁介导的多不饱和脂肪酸的过度过氧化^[2]。脂质氢过氧化物的过度积累导致铁死亡,而 ROS 的积累是铁死亡的关键指标,SOD 和 MDA 是评价脂质过氧化程度的重要指标。近年来研究发现,铁死亡与多种疾病密切相关,包括阿尔茨海默病、缺血性卒中和肿瘤等^[17]。新的研究表明,铁死亡在 TBI 中起关键作用,抑制铁死亡可保护 TBI 后的脑组织和神经功能损伤。例如,GAO 等^[18]发现,膜联蛋白 A5 通过调节 NF- κ B/HMGB1 和 Nrf2/HO-1 通路改善 TBI 诱导的神经炎症和神经元铁死亡。ZHI 等^[19]发现,芍药苷通过拮抗 P53 乙酰化抑制 TBI 后铁死亡从而发现神经保护作用。而且,近年来,IRAK4 与铁死亡的调控关系近年来在炎症相关疾病中逐渐被揭示。IRAK4 作为 TLR/IL-1R 信号通路的核心激酶,通过激活 TAK1-NF- κ B/MAPK 通路促进促炎因子(如 IL-6、TNF- α)释放,同时诱导 NADPH 氧化酶(NOX)产生过量 ROS,加剧氧化应激^[20]。这提示了 IRAK4 在 TBI 后炎症和氧化应激诱导的铁死亡中的可能重要作用,本研究发现,敲低 IRAK4 降低了 TBI 后脑组织中 Fe²⁺ 水平、氧化应激水平和神经元线粒体损伤,提示 IRAK4 可能通过调控铁死亡参与 TBI 恶性进展。

Nrf2 作为调控氧化应激应答的核心转录因子,通过协调细胞内抗氧化防御系统的时空表达,在维持中枢神经系统氧化还原稳态中发挥关键作用^[21]。生理状态下,Nrf2 与 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)结合并驻留于细胞质中;当受到氧化应激或亲电物质刺激时,Nrf2 易位至细胞核内,通过结合 ARE(抗氧化反应元件)启动下游靶基因(如 HO-1、NQO1、GCLC 等)转录。这些 II 相解毒酶和抗氧化酶可协同清除过量 ROS,阻断脂质过氧化链式反应,进而减轻 TBI 后继发性神经损伤^[21]。因此,靶向激活 Nrf2 通路已被广泛认为是干预 TBI 病理进程的潜在治疗策略。KANG 等^[22]研究发现,Orexin-A 可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 TBI 后神经元铁死亡。TANG 等^[23]发现,桉木醇治疗通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 通路对 TBI 后神经细胞铁死亡发挥保护作用。这些研究强调了靶向 Nrf2/HO-1 信号通路调控的神经元

铁死亡在 TBI 进展中的关键作用。最近的证据证实,在炎症相关疾病中 IRAK4 与 Nrf2 存在上下游调控关系^[6],因此,本研究进一步探究敲低 IRAK4 是否通过激活 Nrf2/HO-1 来抑制 ROS 产生,从而抑制铁死亡,结果发现,敲低 IRAK4 促进了 Nrf2 核转位和 HO-1 表达,给予 Nrf2 抑制剂 ML385 后敲低 IRAK4 的保护作用显著下降。这提示 IRAK4 低表达可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路来抑制 ROS 的产生,从而抑制 TBI 后神经元铁死亡。

综上所述,IRAK4 在 TBI 后脑组织中高表达,敲低 IRAK4 可通过激活 Nrf2/HO-1 通路,抑制炎症和氧化应激,从而改善神经元铁死亡。

参考文献

- [1] BERGQUIST T F, KEW C L, WISINGER A M. Traumatic brain injury[J]. Neurol Clin, 2024, 42(4): 863-874.
- [2] LIU J, KANG R, TANG D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J, 2022, 289(22): 7038-7050.
- [3] GENG Z, GUO Z, GUO R, et al. Ferroptosis and traumatic brain injury[J]. Brain Res Bull, 2021, 172: 212-219.
- [4] LIN Y, ZHENG L, XU Y, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) degraders for treating inflammatory diseases: advances and prospects[J]. J Med Chem, 2025, 68(2): 902-914.
- [5] XU X, ZHI T, HUA L, et al. IRAK4 exacerbates traumatic brain injury via activation of TAK1 signaling pathway[J]. Exp Neurol, 2022, 351: 114007.
- [6] ZHANG F, LU L, MA S, et al. Artemisinin attenuates perinatal inflammation and consequent oxidative stress in oligodendrocyte precursor cells by inhibiting IRAK-4 and IRAK-1[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142 (Pt B): 113117.
- [7] MANSOURI A, REINER Ž, RUSCICA M, et al. Antioxidant effects of statins by modulating Nrf2 and Nrf2/HO-1 signaling in different diseases[J]. J Clin Med, 2022, 11(5): 1313.
- [8] 郭瑞俊, 郭佩俊, 韩云彪, 等. 基于氧化应激探讨 Nrf2/HO-1 信号通路与临床疾病关系研究进展[J]. 河北医药, 2022, 44(20): 3157-3162.
- [9] 易宇光, 刘昌平, 何佳佳. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨虾青素对创伤性脑损伤模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国药房, 2023, 34(20): 2490-2496.
- [10] ZHANG H, XING Z, ZHENG J, et al. Ursolic acid ameliorates traumatic brain injury in mice by regulating microRNA-141-mediated PDCD4/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 120: 110258.
- [11] LI P, CHEN J M, GE S H, et al. Pentoxifylline protects against cerebral ischaemia-reperfusion injury through ferroptosis regulation via the Nrf2/SLC7A11/(下转第 77 页)

• 论 著 •

宫颈癌患者血清 TAP、TSGF、TFF3 水平及与肿瘤侵袭、凋亡的关系分析*

张娟,孟祥楠[△],王锋

南京医科大学盐城临床医学院盐城市第三人民医院,江苏盐城 224000

摘要:**目的** 探究宫颈癌患者血清肿瘤异常蛋白(TAP)、恶性肿瘤生长因子(TSGF)、三叶因子 3(TFF3)水平及与肿瘤侵袭、凋亡的关系。**方法** 选取 2021 年 1 月至 2022 年 12 月该院收治的 76 例宫颈癌患者作为癌症组,另选取同期 76 例宫颈癌前病变患者作为癌前病变组。比较血清指标[TAP、TSGF、TFF3、肿瘤抗原-4(TA4)]水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 TAP、TSGF、TFF3 水平对宫颈癌的诊断价值。比较两组肿瘤侵袭、凋亡相关基因[基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2(bcl-2)基因]表达;分析宫颈癌患者血清指标与肿瘤侵袭、凋亡相关基因、临床病理特征之间的关系。**结果** 协方差分析校正年龄、性别后,Ⅲ期宫颈癌患者 TAP、TSGF 和 TFF3 水平高于Ⅱ期和Ⅰ期宫颈癌患者($P<0.05$),肿瘤低分化、有淋巴结转移的宫颈癌患者 TAP、TSGF 和 TFF3 水平高于肿瘤高分化和无淋巴结转移宫颈癌患者($P<0.05$)。癌症组血清 TAP、TSGF、TFF3 和 TA4 水平均高于癌前病变组($P<0.05$)。Pearson 相关性分析结果显示,血清 TAP、TSGF、TFF3 水平分别与 TA4 水平呈正相关($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,血清 TAP、TSGF、TFF3 水平联合诊断宫颈癌的曲线下面积较大,具有良好的诊断价值。癌症组癌组织中 Caspase-3 基因表达水平低于癌前病变组($P<0.05$),MMP-9 和 bcl-2 基因表达水平均高于癌前病变组($P<0.05$)。Pearson 相关性分析结果显示,血清 TAP、TSGF、TFF3 水平分别与癌组织 Caspase-3 基因表达水平呈负相关($P<0.05$),与 MMP-9、bcl-2 基因表达水平呈正相关($P<0.05$)。**结论** 宫颈癌患者血清 TAP、TSGF、TFF3 水平异常升高,且其水平变化可能与肿瘤侵袭、凋亡有关。

关键词:宫颈癌; 肿瘤异常蛋白; 恶性肿瘤生长因子; 三叶因子 3; 侵袭; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.01.013 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2026)01-0072-06 **文献标志码:**A

Levels of serum TAP, TSGF and TFF3, and their relationship with tumor invasion and apoptosis in patients with cervical cancer*

ZHANG Juan, MENG Xiangnan[△], WANG Feng

Yancheng School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Yancheng Third People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224000, China

Abstract:**Objective** To study levels of serum tumor abnormal protein (TAP), malignant tumor growth factor (TSGF) and trefoil factor 3 (TFF3), and their relationship with tumor invasion and apoptosis in patients with cervical cancer. **Methods** A total of 76 cervical cancer patients admitted to the hospital from January 2021 to December 2022 were selected as the cancer group, and another 76 cervical precancerous lesions patients from the same period were selected as the precancerous lesion group. The levels of serum indexes [TAP, TSGF, TFF3, tumor antigen-4 (TA4)] were compared between the two groups, and the diagnostic value of serum levels of TAP, TSGF, and TFF3 for cervical cancer was analyzed using receiver operating characteristic (ROC) curve. The expression of tumor invasion and apoptosis-related genes [matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), B-lymphoblastoma-2 (bcl-2)] was compared between the two groups. The relationship between serum indexes and tumor invasion/apoptosis-related genes, clinicopathological characteristics was analyzed. **Results** After adjusting for age and gender, the levels of TAP, TSGF, and TFF3 in stage Ⅲ patients with cervical cancer were higher than those in stage Ⅱ and stage Ⅰ patients with cervical cancer ($P<0.05$). The levels of TAP, TSGF, and TFF3 in cervical cancer pa-

* 基金项目:盐城市卫生健康项目基金(YK2019101)。

作者简介:张娟,女,主治医师,主要从事妇科肿瘤方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 861957516@qq.com。