



包文慧, 赵佳敏, 巩志国, 白云洁, 于琢雅, 刘博, 毛伟, 张双翼. *MLKL* 在小鼠皮肤伤口愈合过程中的作用[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(10): 230-238.
BAO Wenhui, ZHAO Jiamin, GONG Zhiguo, BAI Yunjie, YU Zhuoya, LIU Bo, MAO Wei, ZHANG Shuangyi. The role of *MLKL* in mediating skin wound healing in Mice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(10): 230-238.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.10.20

MLKL 在小鼠皮肤伤口愈合过程中的作用

包文慧 赵佳敏 巩志国 白云洁 于琢雅 刘博 毛伟 张双翼*

(内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018)

摘要 为探究 *MLKL* 对肌成纤维细胞和巨噬细胞间相互作用过程中的调控作用及对小鼠皮肤伤口愈合的影响, 分别构建野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL* 基因敲除 (*MLKL*^{-/-}) 小鼠背部创伤模型, 分析皮肤伤口愈合情况。体外培养野生型 C57BL/6J 和 *MLKL*^{-/-} 小鼠肌成纤维细胞及骨髓源巨噬细胞, 使用小鼠耳源肌成纤维细胞培养上清液 (Myofibroblast conditioned medium, MFbCM) 处理野生型 C57BL/6J 小鼠 M1 和 M2 型巨噬细胞, 检测 M1 型巨噬细胞 IL-6、TNF- α 及 NO 的分泌量。检测 M2 型巨噬细胞精氨酸酶 (Arginase) 及几丁质酶 3 样分子 (Ym1) 的表达量。结果显示, 1) 相比于野生型 C57BL/6J 小鼠, *MLKL*^{-/-} 小鼠伤口收缩更为缓慢。在损伤后第 5、7 和 10 天, 野生型 C57BL/6J 小鼠创面收缩率显著高于 *MLKL*^{-/-} 小鼠 ($P < 0.001$)。2) *MLKL* 缺失显著降低伤口表面 Ym1 和 Arginase 的表达, 在损伤后第 5、7 和 10 天差异显著 ($P < 0.001$)。此外, *MLKL* 的缺失影响了 MFbCM 上调 M2 型巨噬细胞 Ym1 和 Arginase 表达的能力。表明 *MLKL* 可能参与调控 MFbCM 诱导的 M2 型巨噬细胞分泌活动。3) MFbCM 可促进 M1 型巨噬细胞 IL-6、TNF- α 和 NO 的表达, 且依赖于 *MLKL* 的存在, 表明 *MLKL* 可能参与调控 MFbCM 诱导的 M1 型巨噬细胞分泌活动。综上, 本研究确定了 *MLKL* 参与巨噬细胞和肌成纤维细胞间相互作用, 这种相互作用在伤口愈合的每个阶段都是必不可少的。因此, 该研究将有助于更好地理解 *MLKL* 在创伤愈合中的作用, 为创面愈合提供新的治疗策略。

关键词 *MLKL*; 创伤愈合; 巨噬细胞; 肌成纤维细胞

中图分类号 S859.7

文章编号 1007-4333(2024)10-0230-09

文献标志码 A

The role of *MLKL* in mediating skin wound healing in Mice

BAO Wenhui, ZHAO Jiamin, GONG Zhiguo, BAI Yunjie, YU Zhuoya,

LIU Bo, MAO Wei, ZHANG Shuangyi*

(College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract To explore the regulatory effect of *MLKL* on the interaction between myofibroblasts and macrophages and its effect on skin wound healing in mice, this study constructed back trauma models of wild-type C57BL/6J mice and *MLKL* knockout (*MLKL*^{-/-}) mice to analyze skin wound healing. Myofibroblasts and bone marrow-derived macrophages of Wild-type C57BL/6J mice and *MLKL*^{-/-} mice were cultured *in vitro*. M1 and M2 macrophages of wild-type C57BL/6J mice were treated with mouse ear skin myofibroblast conditioned medium (MFbCM), and the secretion of IL-6, TNF- α and NO in M1 macrophages were detected. The expression of Arginase and chitinase 3-like molecule (Ym1) in M2 macrophages was detected. The results showed that: 1) Compared with wild-type C57BL/6J mice, *MLKL*^{-/-} mice had slower

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32202879); 内蒙古农业大学优秀博士人才引进科研启动项目 (NDYB2021-19); 内蒙古自治区高等学校科学研究重点项目 (NJZZ23035)

第一作者: 包文慧 (ORCID: 0009-0007-7336-9334), 硕士研究生, E-mail: 1905283609@qq.com

通讯作者: 张双翼 (ORCID: 0009-0001-1714-0793), 讲师, 主要研究方向为奶牛生殖系统疾病的发病机制与防控, E-mail: shuangyisau@163.com

wound contraction. On the 5th, 7th and 10th day after injury, the wound contraction rate of wild-type C57BL/6J mice was significantly higher than that of *MLKL*^{-/-} mice ($P < 0.001$). 2) *MLKL* deficiency significantly reduced the expression of Ym1 and Arginase on the wound surface, which were more significant on the 5th, 7th and 10th day after injury ($P < 0.001$). In addition, the deletion of *MLKL* affected the ability of MFbCM to up-regulate the expression of Ym1 and Arginase in M2 macrophages, suggesting that *MLKL* may be involved in the regulation of MFbCM-induced M2 macrophage secretion. 3) MFbCM can promote the expression of IL-6, TNF- α and NO in M1 macrophages, which was dependent on the presence of *MLKL*. It was suggested that *MLKL* may be involved in the regulation of MFbCM-induced M1 macrophage secretion. In summary, this study identified that *MLKL* is involved in the interaction between macrophages and myofibroblasts, which is essential at every stage of wound healing. Therefore, this study will help to better understand the role of *MLKL* in wound healing and provide new therapeutic strategies for wound healing.

Keywords *MLKL*; wound repair; macrophage; myofibroblast

创伤愈合过程涉及到多种细胞及细胞因子共同参与协调,促进上皮重塑和肉芽组织增生^[1-2]。将伤口中的炎症精确地调节到适合促进伤口愈合的水平,但防止阻碍伤口愈合的水平是非常必要的。不同的细胞死亡方式在调节组织炎症和伤口修复中发挥着关键作用。混合谱系激酶结构域样蛋白(*MLKL*)是细胞程序性坏死的一种形式——坏死性凋亡的终末执行者。坏死性凋亡在创面中大量存在,并被认为是通过引起炎症反应影响创面愈合的重要因素^[3]。遗传学研究证明,坏死性凋亡在体内能够促进炎症反应发生^[4]。*MLKL*缺失可以抑制小鼠的皮肤炎症^[5]。此外,有研究表明*MLKL*可促进损伤后的组织再生^[6]。*MLKL*的上游调节因子 RIPK3 也被发现有助于伤口愈合的进展^[7]。

巨噬细胞是组织修复中的主要效应细胞,具有多功能性和可塑性^[8]。肌成纤维细胞对组织修复及疤痕的形成至关重要。巨噬细胞和肌成纤维细胞之间相互作用受到影响,是打破生理性修复和病理性纤维化之间平衡的关键因素^[9]。研究表明,在伤口愈合过程中肌成纤维细胞和巨噬细胞的相互作用能够促进愈合进程^[10]。此外,*MLKL*缺乏可以防止包括巨噬细胞和成纤维细胞在内的细胞发生程序性坏死^[11]。由此推测*MLKL*可能通过调节炎症、参与细胞相互作用或其他过程参与组织修复。然而,目前尚无*MLKL*参与皮肤创伤愈合过程的直接证据。

本研究通过使用*MLKL*^{-/-}小鼠作为模型来研究*MLKL*在皮肤伤口愈合中的作用。探讨*MLKL*在巨噬细胞和肌成纤维细胞相互作用中的影响,为进一步研究*MLKL*在组织损伤修复过程中发挥的具体作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品

胎牛血清(FBS)购自 ExcellBiology 公司;小鼠 IL-6 Elisa 试剂盒购自 Biolegend 公司;总 NO 检测试剂盒购自 Beyo-time 公司;LPS 购自 invivogen 公司;IL-4、IL-13 和 M-CSF 均购自 Peprotech 公司;兔抗 Ym1 多克隆抗体购自 Stemcell Technologies 公司;鼠抗 Arginase 单克隆抗体购自 SANTA 公司;辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自 Cell Signaling Technology 公司;双敏化学发光试剂购自 Affinity Biosciences 公司;Alexa Fluor 647 偶联的山羊抗兔 IgG 二抗购自 Abcam 公司;Alexa Fluor 488 偶联的驴抗大鼠 IgG 二抗购自 Abcam 公司。

1.2 实验动物

野生型 C57BL/6J 小鼠购自南京大学模型动物研究所,*MLKL* 基因敲除小鼠(*MLKL*^{-/-})由内蒙古大学于水星教授馈赠。本试验使用 8 周龄,体重(25±2)g 健康小鼠,将小鼠安置在可以自由饮食饮水且温度、湿度和昼夜节律正常的环境中饲养。

1.3 试验设计

随机选取野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠,各分为 6 组,每组 10 只,使用异氟烷对小鼠进行麻醉,剃除背毛后用 75% 酒精对皮肤进行消毒。使用直径约 6 mm 的圆形打孔器在小鼠背部做圆形创口,使其皮肤伤口自然愈合^[12]。在皮肤创伤后第 0、3、5、7、10、12 和 14 天采集伤口照片,采用图像分析工具 Image J 处理图像,获得小鼠皮肤伤口表面积。根据伤口面积,计算伤口愈合率:(Day0-Day)/Day0×100%。

1.4 小鼠耳皮肤来源的肌成纤维细胞培养

使用已建立方法分离野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠耳皮肤成纤维细胞^[13]。将鼠耳剪碎,在 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 中消化 1 h。将鼠耳组织碎片置于含 10% FBS 和 2% 双抗的 DMEM/F12 培养基的细胞培养瓶中培养 2~5 d。培养 2 周后,将成纤维细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔细胞培养板中,使用含有 TGF- β (100 ng/L) 的 DMEM/F12 培养基(10% FBS 和 2% 双抗)继续培养 5 d,以诱导其分化为肌成纤维细胞。收集肌成纤维细胞培养上清液(Myofibroblast conditioned medium, MFbCM),用于后续试验。

1.5 小鼠骨髓源巨噬细胞培养、诱导分化及鉴定

根据参考 Kitur 等^[14]分离野生型 C57BL/6J 小鼠骨髓源巨噬细胞。分离获得的细胞放置于培养箱中培养。用 PBS 缓冲液从小鼠股骨和胫骨中冲洗出骨髓,使用含有巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF (20 μ g/L) 和 20% FBS 的 RPMI1640 培养基培养 5 d。随后使用 LPS (1 ng/L) 刺激巨噬细胞 24 h,诱导其分化为 M1 型巨噬细胞。使用 IL-4 (20 μ g/L) 和 IL-13 (20 μ g/L) 刺激巨噬细胞 48 h,诱导其分化为 M2 型巨噬细胞。使用 Alexa Fluor 647 偶联抗小鼠 CD11b 流式抗体和 Alexa Fluor 488 偶联抗小鼠 CD86 流式抗体对 M1 型小鼠骨髓源巨噬细胞进行流式细胞术鉴定。使用 Alexa Fluor 647 偶联抗小鼠 CD11b 流式抗体和 Alexa Fluor 488 偶联抗小鼠 CD163 流式抗体对 M2 型巨噬细胞进行流式细胞术鉴定,以判断阳性细胞的比率。

1.6 免疫荧光染色技术检测小鼠皮肤创面组织中 Ym1 和 Arginase 的表达

通过免疫荧光染色比较 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠在皮肤创面损伤后 14 d 内的愈合情况。检测皮肤创面组织中精氨酸酶(Arginase)及几丁质酶 3 样分子(Ym1)的表达情况^[15-16]。具体方法如下:制作小鼠皮肤创面组织冰冻切片(6 μ m),冰丙酮固定 10 min,室温下封闭液孵育 1 h,避光过夜孵育兔抗 Ym1 多克隆抗体(1:50)和鼠抗 Arginase 单克隆抗体(1:100)。室温下避光孵育二抗 1 h,使用 DAPI 进行细胞核染色。使用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM)观察,获得图片及荧光强度值。

1.7 ELISA 检测

在 C57BL/6J 野生型小鼠 M1 型巨噬细胞中加

入 C57BL/6J 小鼠耳皮肤来源肌成纤维细胞培养上清液(C57BL/6J MFbCM)或 *MLKL*^{-/-} 小鼠耳皮肤来源肌成纤维细胞培养上清液(*MLKL*^{-/-}MFbCM),处理巨噬细胞 24 h,同时设置不处理实验组。收集细胞培养上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测细胞培养上清液中 IL-6 和 TNF- α 的分泌水平。

1.8 NO 含量检测

同 1.7 处理 M1 型巨噬细胞后,收集细胞培养上清液。通过检测 M1 巨噬细胞上清液中 NO 代谢物亚硝酸盐的含量以评估 NO 的含量。具体方法如下:在酶标板中分别加入样品及标准品,加入 5 μ L NADPH, 10 μ L FAD, 5 μ L Nitrate Reductase,混匀后在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min。加入 10 μ L LDH Buffer, 10 μ L LDH,混匀后在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min。加入 50 μ L Griess Reagent I, 50 μ L Griess Reagent II,混匀。使用酶标仪检测波长在 540 nm 处的吸光值。

1.9 Western Blot 分析

在 C57BL/6J 野生型小鼠 M2 型巨噬细胞中加入 C57BL/6J MFbCM 或 *MLKL*^{-/-}MFbCM,处理巨噬细胞 24 h,同时设置不处理试验组。提取细胞蛋白进行电泳。方法如下:配置 SDS-PAGE 凝胶,加入蛋白样品(10 μ g);PVDF 膜转印(恒压 25 V, 30 min);3% BSA 的 TBST 中室温封闭 4 h;兔抗 Ym1 多克隆抗体(1:1 000)和鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:5 000)分别过夜孵育 PVDF 膜;使用辣根过氧化物酶 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG(1:5 000)或 HRP 偶联的兔抗小鼠 IgG(1:5 000)在室温条件下避光孵育 1 h;使用双敏化学发光试剂和化学发光成像系统进行图像的采集,使用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

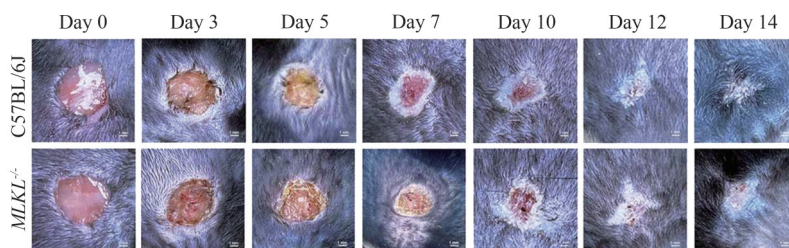
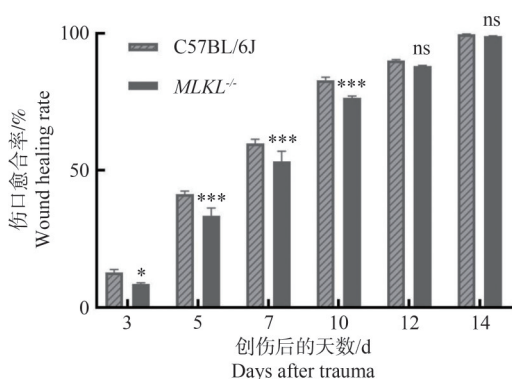
1.10 统计分析

使用 GraphPad Prism 8 软件对所有数据统计并进行差异性分析 3 次重复试验数,据 $\bar{X} \pm SD$, One-Way ANOVA,以 $P < 0.05$ 为差异显著(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 *MLKL* 基因对鼠背部伤口愈合的影响

在伤口愈合的第 0、3、5、7、10、12 和 14 天分别比较野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠背部伤口愈合情况。通过图 1 可知,相比于野生型 C57BL/6J 小鼠,*MLKL*^{-/-} 小鼠伤口收缩迟缓。通过图 2 可知

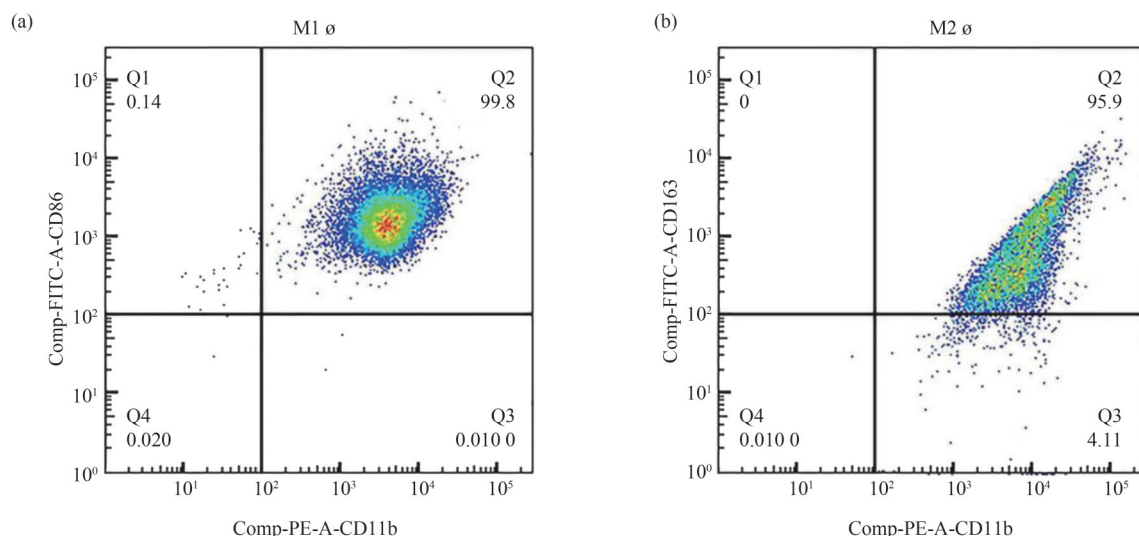
图 1 野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠皮肤伤口愈合情况Fig.1 Skin wound healing in wild-type C57BL/6J mice and *MLKL*^{-/-} mice图 2 野生型 C57BL/6J 小鼠和 *MLKL*^{-/-} 小鼠伤口愈合情况Fig.2 Skin wound healing in wild-type C57BL/6J mice and *MLKL*^{-/-} mice

在皮肤损伤后第 5、7 和 10 天,野生型 C57BL/6J 小鼠创面收缩率极显著高于 *MLKL*^{-/-} 小鼠 ($P <$

0.001)。结果表明, *MLKL* 功能的缺失影响皮肤伤口愈合过程。

2.2 小鼠巨噬细胞细胞诱导分化与鉴定

在 LPS 处理野生型 C57BL/6J 小鼠巨噬细胞后, M1 型巨噬细胞表面标记物 CD86 和 CD11b 双阳性细胞的比例为 99.8% (图 3(a))。在 20 μ g/L IL-4 和 20 μ g/L IL-13 处理野生型 C57BL/6J 小鼠巨噬细胞后, M2 型巨噬细胞表面标记物 CD163 和 CD11b 双阳性细胞比例为 95.9% (图 3(b))。结果表明, 本试验成功培养巨噬细胞, 通过 LPS 的处理成功将巨噬细胞诱导分化为 M1 型巨噬细胞, 通过 IL-4 和 IL-13 的处理成功将巨噬细胞诱导分化为 M2 型巨噬细胞, 且具有较好的诱导效果和较高的分化比率。



(a) 流式细胞术检测 M1 型巨噬细胞表面标记物; (b) 流式细胞术检测 M2 型巨噬细胞表面标记物。

(a) The surface markers of M1 macrophages were detected by flow cytometry; (b) The surface markers of M2 macrophages were detected by flow cytometry.

图 3 流式细胞术检测巨噬细胞表面标记物

Fig.3 The surface markers of macrophages were detected by flow cytometry

2.3 *MLKL* 对创面组织 Ym1 和 Arginase 表达的影响

通过免疫荧光染色技术检测小鼠皮肤损伤后创面组织中的 Ym1 和 Arginase 表达情况(图4)。结

果表明,皮肤损伤后第5天和第7天(图5),在基因敲除 *MLKL* 小鼠的伤口表面观察到 Arginase(图5(a))和 Ym1(图5(b))表达相比于野生型 C57BL/6J 小鼠显著降低($P < 0.001$)。

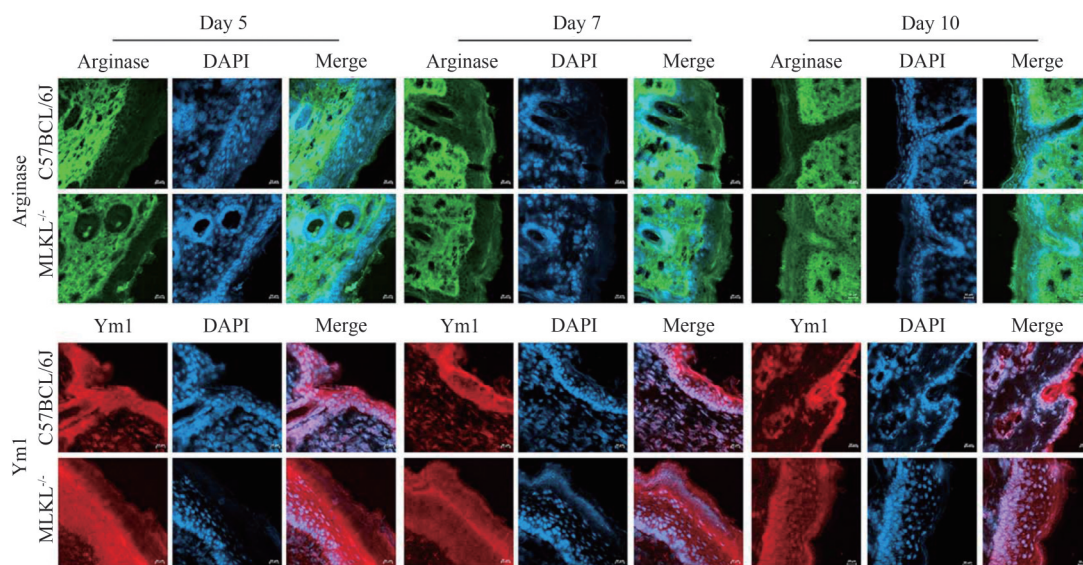
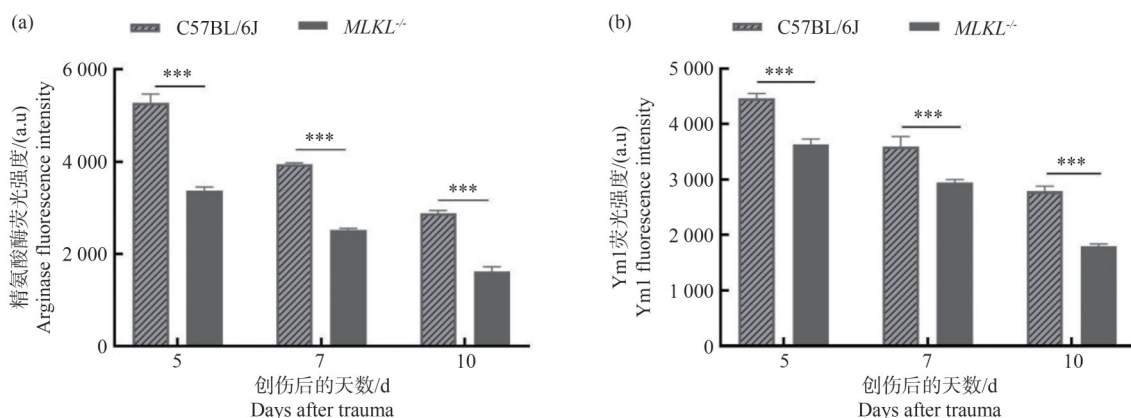


图4 小鼠皮肤创面组织中 Ym1 和 Arginase 免疫荧光染色($\times 200$)

Fig.4 Immunofluorescence staining of Ym1 and Arginase in mouse skin wound tissue



(a)精氨酸酶荧光强度;(b) Ym1 荧光强度。

(a) Arginase fluorescence intensity;(b) Ym1 fluorescence intensity.

图5 小鼠皮肤创面组织中 Ym1 和 Arginase 免疫荧光染色分析图

Fig.5 Immunofluorescence staining analysis of Ym1 and Arginase in mouse skin wound tissue

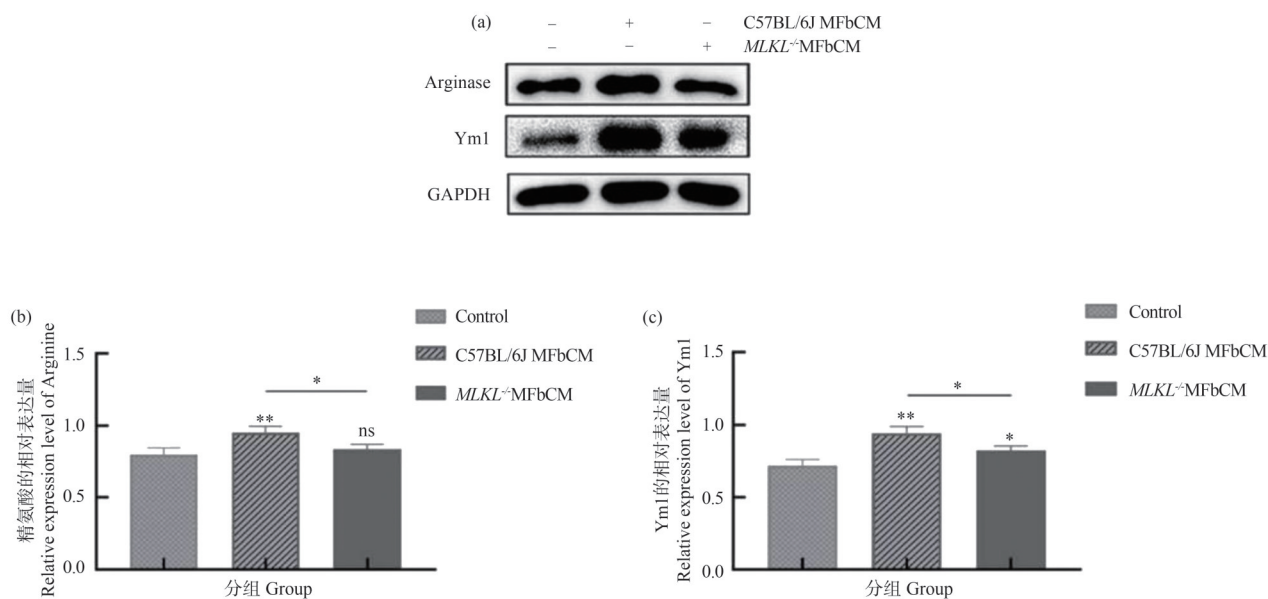
2.4 *MLKL* 对 MFbCM 诱导的 M2 型巨噬细胞 Ym1 和 Arginase 表达的影响

在 M2 型巨噬细胞中加入 C57BL/6J MFbCM 或 *MLKL*^{-/-}MFbCM, 24 h 后检测 M2 型巨噬细胞 Ym1 和 Arginase 蛋白表达量(图6(a))。结果表明, *MLKL*^{-/-}MFbCM 处理的巨噬细胞中 Arginase(图6(b))和 Ym1(图6(c))表达水平与 C57BL/6J MFbCM

相比处于较低水平($P < 0.01$)。

2.5 *MLKL* 对 MFbCM 诱导的 M1 型巨噬细胞 *IL-6*、*TNF-α* 及 NO 分泌的影响

根据图7和8得知, C57BL/6J MFbCM 和 *MLKL*^{-/-}MFbCM 均可显著上调 M1 型巨噬细胞中 *IL-6*(图7(a))、*TNF-α*(图7(b))及 NO(图8)分泌量($P < 0.001$), 且 C57BL/6J MFbCM 上调现象更



(a) 蛋白免疫印迹条带图; (b) M2 型巨噬细胞 Arginase 蛋白表达量; (c) M2 型巨噬细胞 Ym1 蛋白表达量

(a) Protein immunoblotting band map; (b) Arginase protein expression in M2 macrophages; (c) Ym1 protein expression in M2 macrophages.

图 6 C57BL/6J MFbCM 或 *MLKL*^{-/-} MFbCM 对 M2 型巨噬细胞 Arginase 和 Ym1 的表达

Fig.6 Expression of Ym1 and Arginase in M2 macrophages by C57BL/6J MFbCM or *MLKL*^{-/-} MFbCM

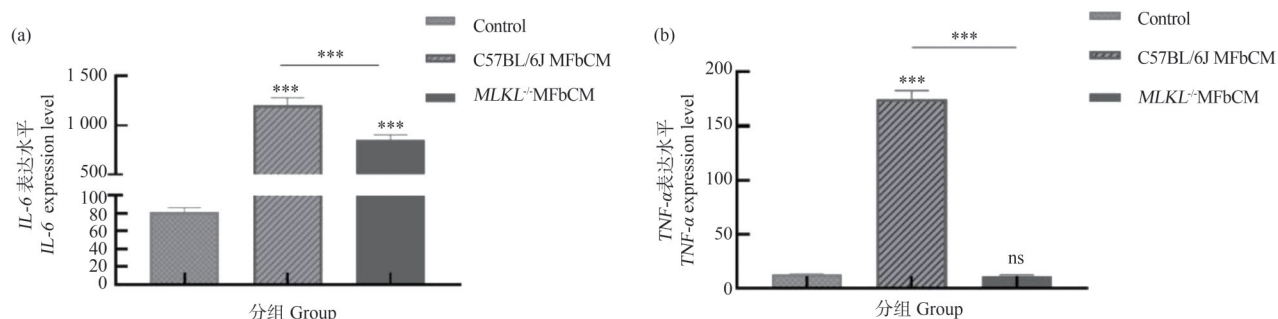


图 7 C57BL/6J MFbCM 和 *MLKL*^{-/-} MFbCM 对 M1 型巨噬细胞 *IL*-6(a) 和 *TNF*-α(b) 分泌量的影响

Fig.7 Effects of C57BL/6J MFbCM and *MLKL*^{-/-} MFbCM on *IL*-6 secretion (a) and *TNF*-α secretion (b) in M1 macrophages

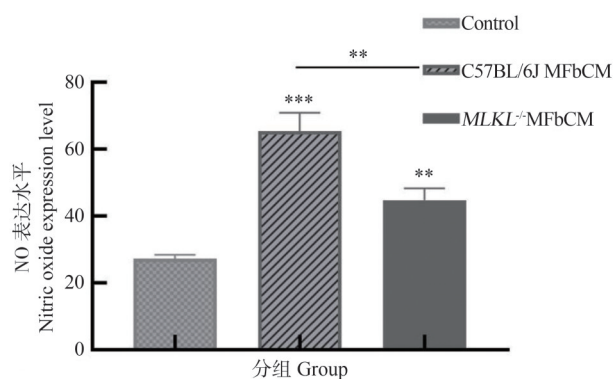


图 8 C57BL/6J MFbCM 和 *MLKL*^{-/-} MFbCM 对 M1 型巨噬细胞 NO 表达量的影响

Fig.8 The effects of C57BL/6J MFbCM and *MLKL*^{-/-} MFbCM on nitric oxide expression in M1 macrophages

为显著($P < 0.001$)。结果表明, *MLKL* 缺失显著影响 *IL*-6、*TNF*-α 及 NO 的分泌量。

3 讨论

细胞死亡和炎症反应是宿主对抗病原体入侵的免疫反应的关键组成部分。局部炎症反应可以促进组织修复。然而,过度的炎症浸润会干扰正常的愈合过程,如胶原沉积、血管生成和肉芽组织形成^[17-18]。程序性细胞死亡在维持细胞稳态,即细胞增殖和细胞死亡的平衡中发挥重要作用^[19]。人们普遍认为, *MLKL* 依赖性坏死可导致有害病理。与这一观点相反,本研究已经证明 *MLKL* 对正常皮肤伤口愈合非常重要。程序性坏死是由 RIPK3 激活

介导的非 caspase 依赖性的细胞死亡机制^[20]。研究表明,在损伤后 14 d 中,RIPK3 缺乏显著延迟了伤口闭合,与野生型小鼠创面相比,RIPK3 缺陷降低了创面的愈合质量,表现为再上皮化受损、血管生成延迟、肉芽组织不规则和胶原沉积^[5]。*MLKL* 是 RIPK3 的功能性底物,是坏死信号转导的衔接蛋白^[21]。RIPK3 和 *MLKL* 在创面早期均有过表达。损伤后创面愈合率表明,*MLKL* 缺失减缓了小鼠皮肤创面愈合。这一现象与 Martens 等^[6]的研究结果一致,即 *MLKL* 可以促进损伤后的组织再生。因此,探究 *MLKL* 介导的皮肤伤口愈合调控机制对了解皮肤发育和创面修复十分必要。Shook 等^[22]的研究表明,在皮肤修复过程中,巨噬细胞促进肌成纤维细胞的增殖和异质性。巨噬细胞具有多种不同的表型,在创面愈合过程中发挥重要作用。促炎的 M1 型巨噬细胞可诱导持续炎症和组织降解,抑制细胞增殖和伤口愈合,而抗炎的 M2 型巨噬细胞可有效促进成纤维细胞迁移、血管生成和组织修复^[23]。Wu 等^[24]研究表明,在 LPS 刺激下,*MLKL* 基因敲除小鼠的巨噬细胞 IL-6 表达水平低于野生型 C57 小鼠巨噬细胞。与该研究结果一致的是,当用 *MLKL*^{-/-}MFbCM 替代 C57BL/6J MFbCM 处理 M1 巨噬细胞时,并没有获得增强的 IL-6、TNF- α 和 NO 的产生。因此,*MLKL* 参与创面愈合不仅依赖于炎症反应,还依赖于 M1 型巨噬细胞与肌成纤维细胞的相互作用,共同维持创面早期微环境。此外,*MLKL* 能够破坏细胞膜,释放细胞内容物,*MLKL* 缺失可能导致更少的炎症细胞因子释放到伤口环境。*MLKL* 缺陷影响皮肤创面愈合,可能与创面验证反应有关,尤其是在创面愈合早期。

已有研究表明,巨噬细胞消融减少了创面肌成纤维细胞的数量,损害了肌成纤维细胞的功能,并损害了创面愈合^[25]。Buechler 等^[26]对成纤维细胞和巨噬细胞的特性进行了深入研究,这 2 种细胞通过直接相互作用在维持组织稳态方面发挥多种功能。然而,在病理性刺激下,M2 型巨噬细胞与成纤维细胞之间的相互作用不能及时终止,从而导致病理性纤维化。Ym1 和 Arginase 主要出现在损伤部位的巨噬细胞,可作为 M2 型巨噬细胞的生物标志物^[27]。缺乏 Arginase 已被证明会损害皮肤伤口愈合,而过度

产生 Arginase 则会促进纤维化^[28]。有报道称 Ym1 阳性巨噬细胞参与调节肌成纤维细胞分化,血管生成和组织形成^[29]。在 M2 型巨噬细胞中,经 C57BL/6J MFbCM 处理后,Arginase 和 Ym1 的表达上调,而经 *MLKL*^{-/-}MFbCM 处理后,这种调节作用反而被抑制,表明肌成纤维细胞表达的 *MLKL* 可以参与 M2 型巨噬细胞的极化。本实验室先前研究表明,NLRP3 缺失影响肌成纤维细胞诱导巨噬细胞功能,*MLKL* 作为激活 NLRP3 炎性小体的信号,可能通过影响 NLRP3 从而影响 2 种细胞相互作用^[10]。本研究推测,一方面 *MLKL* 通过调节坏死诱导的炎症反应参与创面愈合,另一方面 *MLKL* 参与创面愈合不仅依赖于炎症期的坏死,还有助于组织再生。

因此,本研究通过初步探究 *MLKL* 在细胞相互作用过程中的调控机制,为进一步研究 *MLKL* 在组织损伤修复过程中发挥的具体作用提供理论基础。深入了解组织损伤愈合过程中涉及的相关分子,有助于发现新的分子靶点,为组织损伤提供新的治疗策略。然而,*MLKL* 通过何种途径对 2 种细胞相互作用和皮肤伤口愈合过程进行调控目前尚未明确,需要进一步探讨。

4 结 论

MLKL 缺失显著减缓小鼠皮肤伤口愈合进程。肌成纤维细胞能够增强 M1 型巨噬细胞分泌活动,同时促进 M2 型巨噬细胞极化。此外,*MLKL* 在肌成纤维细胞对 M1/M2 巨噬细胞功能的调控方面发挥关键作用,进而影响创面愈合进程。

参考文献 References

- [1] Qian Y N, Zheng Y J, Jin J, Wu X, Xu K J, Dai M L, Niu Q, Zheng H, He X J, Shen J L. Immunoregulation in diabetic wound repair with a photoenhanced glycyrrhizic acid hydrogel scaffold [J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(29): 2200521
- [2] Mssillou I, Bakour M, Slighoua M, Laaroussi H, Saghrouchni H, Amrati F E Z, Lyoussi B, Derwich E. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 298: 115663
- [3] Khandelwal P, Das A, Sen C K, Srinivas S P, Roy S, Khanna S. A surfactant polymer wound dressing protects human keratinocytes from inducible necroptosis [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 4357
- [4] Newton K, Dugger D L, Maltzman A, Greve J M, Hedehus M, Martin-

- McNulty B, Carano R A D, Cao T C, van Bruggen N, Bernstein L, Lee W P, Wu X, DeVoss J, Zhang J, Jeet S, Peng I, McKenzie B S, Rose-Girma M, Caplazi P, Diehl L, Webster J D, Vucic D. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23(9): 1565-1576
- [5] Moerke C, Bleibaum F, Kunzendorf U, Krautwald S. Combined knockout of RIPK3 and MLKL reveals unexpected outcome in tissue injury and inflammation [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7: 19
- [6] Martens S, Bridelance J, Roelandt R, Vandenabeele P, Takahashi N. MLKL in cancer: More than a necroptosis regulator [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2021, 28(6): 1757-1772
- [7] Godwin A, Sharma A, Yang W L, Wang Z, Nicastro J, Coppa G F, Wang P. Receptor-interacting protein kinase 3 deficiency delays cutaneous wound healing [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140514
- [8] Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen C K, Roy S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration [J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(10): 2596-2606
- [9] Schuster R, Younesi F, Ezzo M, Hinz B. The role of myofibroblasts in physiological and pathological tissue repair [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2023, 15(1): a041231
- [10] 赵佳敏, 李茜如, 高飞菲, 巩志国, 顾柏臣, 白云洁, 刘博. NLRP3 在介导小鼠皮肤伤口修复过程中的作用 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(4): 733-739
- Zhao J M, Li Q R, Gao F F, Gong Z G, Gu B C, Bai Y J, Liu B. Roles of NLRP3 in mediating skin wound repair in mice [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(4): 733-739 (in Chinese)
- [11] Chen Y, Li X S, Hua Y Y, Ding Y, Meng G L, Zhang W. RIPK3-mediated necroptosis in diabetic cardiomyopathy requires CaMKII activation [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 6617816
- [12] Song J Y, Zhu K Y, Wang H P, Wu M, Wu Y P, Zhang Q. Deciphering the emerging role of programmed cell death in diabetic wound healing [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2023, 19(15): 4989-5003
- [13] Maelfait J, Liverpool L, Rehwinkel J. Nucleic acid sensors and programmed cell death [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(2): 552-568
- [14] Kitur K, Wachtel S, Brown A, Wickersham M, Paulino F, Peñaloza H F, Soong G, Bueno S, Parker D, Prince A. Necroptosis promotes *Staphylococcus aureus* clearance by inhibiting excessive inflammatory signaling [J]. *Cell Reports*, 2016, 16(8): 2219-2230
- [15] Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(10 Suppl): 2820S-2825S; discussion 2853S
- [16] MacMicking J, Xie Q W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function [J]. *Annual Review of Immunology*, 1997, 15: 323-350
- [17] Huang C, Dong L L, Zhao B H, Lu Y F, Huang S R, Yuan Z Q, Luo G X, Xu Y, Qian W. Anti-inflammatory hydrogel dressings and skin wound healing [J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2022, 12(11): p. e1094
- [18] Kharaziha M, Baidya A, Annabi N. Rational design of immunomodulatory hydrogels for chronic wound healing [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(39): e2100176
- [19] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462
- [20] Cho Y S, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray T D, Guildford M, Chan F K M. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1112-1123
- [21] Sun L M, Wang H Y, Wang Z G, He S D, Chen S, Liao D H, Wang L, Yan J C, Liu W L, Lei X G, Wang X D. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase [J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 213-227
- [22] Shook B A, Wasko R R, Rivera-Gonzalez G C, Salazar-Gatzimas E, López-Giráldez F, Dash B C, Muñoz-Rojas A R, Aultman K D, Zwick R K, Lei V, Arbiser J L, Miller-Jensen K, Clark D A, Hsia H C, Horsley V. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair [J]. *Science*, 2018, 362(6417): eaar2971
- [23] Ji J, Hu S L, Cui Z W, Li W F. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages [J]. *Archives of Microbiology*, 2013, 195(5): 349-356
- [24] Wu J F, Huang Z, Ren J M, Zhang Z R, He P, Li Y X, Ma J H, Chen W Z, Zhang Y Y, Zhou X J, Yang Z T, Wu S Q, Chen L F, Han J H. Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis [J]. *Cell Research*, 2013, 23(8): 994-1006
- [25] Mirza R, DiPietro L A, Koh T J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice [J]. *The American Journal of Pathology*, 2009, 175(6): 2454-2462
- [26] Buechler M B, Turley S J. A short field guide to fibroblast function in immunity [J]. *Seminars in Immunology*, 2018, 35: 48-58
- [27] Ma H L, Zhong W B, Jiang Y L, Fontaine C, Li S Q, Fu J N, Olkkonen V M, Staels B, Yan D G. Increased atherosclerotic lesions in LDL receptor deficient mice with hematopoietic nuclear receptor Rev-erba knock-down [J]. *Journal of the American Heart Association*, 2013, 2(4): e000235
- [28] Moura V B L, Silva M M, Batista L F, Gomes C M, Leenen P J M, Lino R S Jr, Oliveira M A P. Arginase activity is associated with fibrosis in experimental infection with *Taenia crassiceps*, but does not play a major role in resistance to infection [J]. *Experimental Parasitology*, 2013, 135(3): 599-605
- [29] Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Emig S A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair [J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184(7): 3964-3977

责任编辑: 秦梅



第一作者简介:包文慧,女。就读于内蒙古农业大学,兽医学院,临床硕士研究生。主要研究方向为奶牛生殖系统疾病的发病机制与防控。参与内蒙古农业大学优秀博士人才引进科研启动项目1项(NDYB2021-19)。



通讯作者简介:张双翼,内蒙古农业大学,兽医学院,讲师。主要研究方向为奶牛生殖系统疾病的发病机制与防控。截止目前,已证实前列腺素在奶牛子宫内膜生长过程中发挥重要作用,且对维持奶牛子宫内环境稳态具有重要作用,为临床上更加合理使用药物治疗奶牛子宫内膜炎提供了理论依据。截止目前,以第一作者或共同一作发表论文16篇,其中SCI论文14篇(中科院一区Top期刊2篇,中科院二区Top期刊1篇)。主持国家自然科学基金委员会青年科学基金项目1项(32202879)、内蒙古自治区教育厅自然学科研究重点项目1项(NJZZ23035)、内蒙古自治区留学人员创新创业启动支持计划项目1项、内蒙古农业大学优秀博士人才引进科研启动项目1项(NDYB2021-19)。