· 论著 ·

1,25-二羟维生素D_3介导VDR-NLRP6调节Th17/Treg细胞平衡改善脓毒症诱导的急性肾损伤

罗欣,马玉东,吕明锦,于慧超
(沈阳医学院附属中心医院重症医学一科,沈阳 110024)

摘要 目的 探讨1,25-二羟维生素D_3(VD_3)调节Th17/Treg细胞平衡改善脓毒症诱导的急性肾损伤(AKI)的机制。**方法** 将C57BL/6小鼠分为假手术组、脓毒症组(CLP组)、VD_3组、VD_3+敲减对照(VD_3+sh-NC)组和VD_3+敲减*NLRP6*(VD_3+sh-NLRP6)组,每组10只。通过盲肠结扎穿刺(CLP)建立脓毒症AKI小鼠模型。用HE染色观察各组小鼠肾组织病理损伤;用ELISA检测各组小鼠血肌酐(sCr)、肾损伤分子1(KIM-1)、白细胞介素-17(IL-17)和白细胞介素-10(IL-10)水平;用流式细胞术检测各组小鼠外周血Th17和Treg细胞比例;用Western blotting检测各组小鼠肾组织中维生素D受体(VDR)和NLRP6蛋白表达。**结果** 给予VD_3可减轻CLP小鼠肾组织病理损伤,降低小鼠血清中sCr、KIM-1、IL-17水平及外周血Th17细胞比例,增加小鼠外周血Treg细胞比例和血清中IL-10水平,上调小鼠肾组织中VDR和NLRP6蛋白表达;敲减*NLRP6*逆转了VD_3对CLP小鼠Th17/Treg细胞失衡的改善作用及其肾保护作用。**结论** VD_3在脓毒症诱导的AKI中发挥保护作用,其机制可能涉及激活VDR,进而上调NLRP6表达,最终改善Th17/Treg细胞失衡有关。

关键词 1,25-二羟维生素D_3;脓毒症;急性肾损伤;Th17/Treg细胞平衡;维生素D受体;NLRP6
中图分类号 R692.5 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)08-0690-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.r.20250728.1700.008
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.08.004

1,25-dihydroxyvitamin D_3 regulates the Th17/Treg cell balance and improves sepsis-induced acute kidney injury via mediating VDR-NLRP6

LUO Xin, MA Yudong, LÜ Mingjin, YU Huichao
(Department 1 of Critical Care Medicine, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China)

Abstract Objective To determine the mechanism by which 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (VD_3) regulates the Th17/Treg cell balance to improve sepsis-induced acute kidney injury (AKI). **Methods** C57BL/6 mice were assigned to a sham operation group (sham group), a sepsis group (CLP group), a VD_3 group, a VD_3+knockdown control group (VD_3+sh-NC group), and a VD_3+*NLRP6* knockdown group (VD_3+sh-NLRP6 group) (n = 10 per group). A mouse model of sepsis-induced AKI was established by cecal ligation and puncture (CLP). Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological damage to renal tissue. ELISA was used to detect the serum creatinine (sCr), kidney injury molecule 1 (KIM-1), interleukin (IL)-17, and IL-10 levels. Flow cytometry was used to determine the Th17 cell and Treg cell numbers in peripheral blood. Western blotting was used to detect the expression of vitamin D receptor (VDR) and NLRP6 proteins in renal tissue. **Results** Administration of VD_3 alleviated the pathological kidney damage in CLP mice, reduced the sCr, KIM-1, and IL-17 levels and the proportion of Th17 cells in peripheral blood. It also increased the proportion of Treg cells and the IL-10 level, and upregulated the expression of VDR and NLRP6 proteins. Knockdown of *NLRP6* reversed the effect of VD_3 on the Th17/Treg cell imbalance and its renoprotective effects in CLP mice. **Conclusion** VD_3 exerts protective effects in sepsis-induced AKI. Its mechanism likely involves the activation of VDR, leading to subsequent upregulation of NLRP6 expression, ultimately improving the Th17/Treg cell imbalance.

Keywords 1,25-dihydroxyvitamin D_3; sepsis; acute kidney injury; Th17/Treg cell balance; vitamin D receptor ; NLRP6

脓毒症是宿主对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍,是全球重症监护室患者死亡的主要原因,相关死亡人数甚至超过了肠癌和乳腺癌致死人数[1]。包括急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)在内的器官损伤是脓毒症的标志,脓毒症重症患者AKI的发病率可能高达70%,导致的死亡率高达50%[2-3]。AKI严重影响患者的预后,且存活的患

基金项目: 辽宁省科学技术计划(2022-MS-20)
作者简介: 罗欣(1997-),女,医师,硕士研究生.
通信作者: 于慧超,E-mail:beta7810@163.com
收稿日期: 2024-09-29
网络出版时间: 2025-07-29 14:04:34

者常出现慢性肾功能不全。免疫紊乱可能在脓毒症的发展中发挥至关重要的作用,脓毒症早期和晚期的免疫过量和免疫抑制与T淋巴细胞密切相关[4]。辅助性T(helper T,Th)17细胞和调节性T(regulatory T,Treg)细胞是$CD4^+$T细胞的2个亚群,它们的平衡是免疫稳态的关键因素,Th17/Treg细胞失衡与脓毒症诱导的AKI有关[5]。因此,改善脓毒症诱导的Th17/Treg细胞失衡可能是治疗脓毒症诱导的AKI的有效策略。

维生素D可促进巨噬细胞吞噬作用,调节单核细胞免疫功能,减少炎性细胞因子产生。AKI中维生素D失衡可影响免疫功能[6]。维生素D的活性代谢产物1,25–二羟维生素D_3[1,25-dihydroxyvitamin D_3,VD_3]由肾脏转化维生素D获得,因此,发生AKI时,维生素D产生减少[6]。最近的研究[7]发现,VD_3可通过激活其受体改善脂多糖诱导的AKI。然而,VD_3改善脓毒症诱导AKI的机制目前尚不清楚。本研究拟通过盲肠结扎穿刺(cecum ligation and puncture,CLP)建立脓毒症小鼠模型,探讨VD_3是否通过调节Th17/Treg细胞失衡改善脓毒症诱导的AKI及其机制,为VD_3作为脓毒症AKI的有效治疗药物提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

VD_3、淋巴细胞分离液购自美国Sigma-Aldrich公司;Western blotting相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;Western blotting相关抗体购自英国abcam公司;流式细胞抗体购自美国eBioscience公司;ELISA试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司;酶标仪购自美国BioTek公司;凝胶扫描成像系统购自美国Bio-Rad公司;流式细胞仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2　方法

1.2.1　动物分组和处理:SPF级8周龄C57BL/6雄性小鼠,体重20~25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠饲养于22~24 ℃以及光照/黑暗周期12 h的环境中。将小鼠分为假手术组、脓毒症组(CLP组)、VD_3组、VD_3+敲减对照组(VD_3+sh-NC组)和VD_3+敲减核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白6(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 6,*NLRP6*)基因组(VD_3+sh-NLRP6组),每组10只。除假手术组外,各组小鼠采用CLP制备脓毒症相关AKI模型。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50~60 mg/kg)麻醉后固定于手术台上,沿腹白线作正中切口,用4号手术线在距盲肠末端1 cm处结扎,用18号针头贯穿盲肠远端两侧肠壁2次,挤出少量肠内容物,并将少量内容物留于腹腔,逐层缝合。假手术组小鼠仅暴露盲肠。VD_3组、VD_3+sh-NC组和VD_3+sh-NLRP6组小鼠腹腔注射VD_3(100 μg/kg)。VD_3+sh-NC组和VD_3+sh-NLRP6组小鼠于造模前24 h经尾静脉注射敲减对照和敲减*NLRP6*腺病毒(4 nmol/kg)。药物注射后24 h,经眼球取血,采血后脱颈椎处死小鼠,并留取小鼠左肾组织。

1.2.2　HE染色:用4%多聚甲醛固定小鼠肾组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋后,制成厚4 μm石蜡切片。经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后,依次用苏木素和伊红进行染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3　ELISA:将收集的小鼠血液于4 ℃下1 500 *g*离心15 min,收集上层血清。将血清样本加入酶标板中,按照ELISA试剂盒说明书检测血肌酐(serum creatinine,sCr)、肾损伤分子1(kidney injury molecule-1,KIM-1)、白细胞介素–17(interleukin-17,IL-17)和白细胞介素–10(interleukin-10,IL-10)水平。

1.2.4　流式细胞术:用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,并利用免疫磁珠收集T淋巴细胞,用PBS洗涤后,加入CD4和IL-17A抗体,避光孵育20 min,检测Th17细胞,加入CD4、CD25和Foxp3抗体,避光孵育20 min,检测Treg细胞。孵育后细胞在流式细胞仪上机检测。

1.2.5　Western blotting:收集的小鼠肾组织用液氮速冻后,用研钵研碎,加入RIPA裂解液,用超声破碎仪于冰上超声后,4 ℃下12 000 *g*离心20 min,收集上清。BCA法检测提取的蛋白浓度,并根据浓度将蛋白稀释至2 μg/μL。取30 μg蛋白上样,SDS-PAGE分离蛋白,湿转法将蛋白转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗4 ℃孵育过夜,PBST洗涤3次,二抗室温孵育1 h,PBST洗涤3次,ECL发光。

本研究获得沈阳医学院实验动物伦理委员会批准。

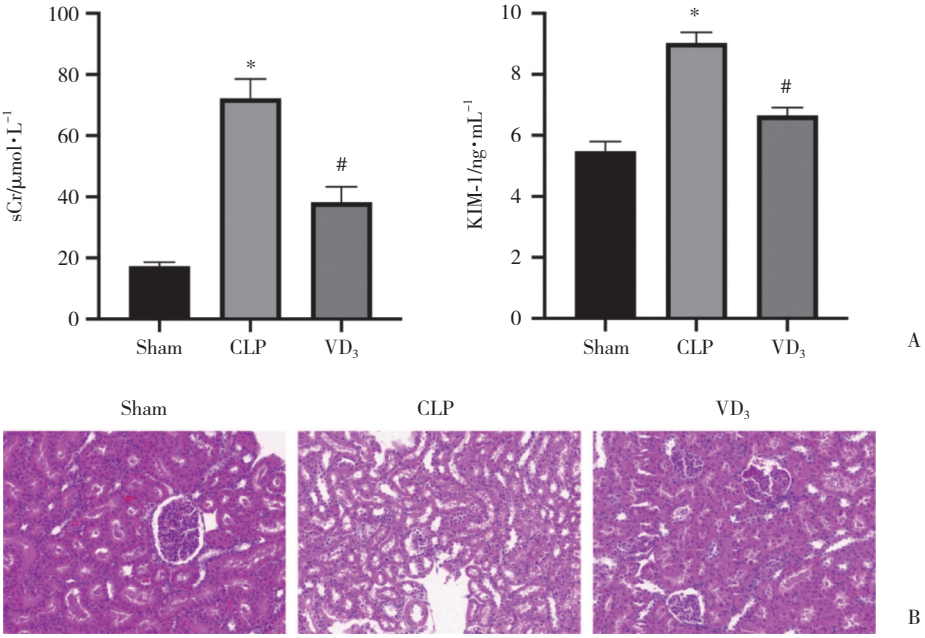
1.3　统计学分析

采用SPSS 27.0软件进行统计学分析，数据采用$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，数据均符合方差齐性，各组间两两比较采用Tukey事后检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　VD_3对脓毒症AKI小鼠肾损伤的影响

ELISA结果显示，与假手术组相比，CLP组小鼠血清中sCr和KIM-1水平升高（$P<0.05$）；与CLP组相比，VD_3组小鼠血清sCr和KIM-1水平降低（$P<0.05$），见图1A。HE染色结果显示，假手术组小鼠肾组织结构完整，未见出血和炎症细胞浸润；CLP组小鼠肾小管上皮细胞水肿且体积变大，肾小球结构紊乱，间质内可见明显出血和大量浸润的炎症细胞；VD_3组小鼠肾组织病理损伤减轻，肾组织结构较完整，间质内出血和浸润的炎症细胞较少，见图1B。



A，sCr and KIM-1 levels detected by ELISA；B，HE staining results（×200）. * $P<0.05$ vs. sham group；# $P<0.05$ vs. CLP group.

图1　VD_3对脓毒症AKI小鼠肾损伤的影响

Fig.1　Effects of VD_3 on renal injury of mice with sepsis induced AKI

2.2　VD_3对脓毒症AKI小鼠Th17/Treg细胞失衡的影响

流式细胞术检测结果显示，与假手术组相比，CLP组小鼠外周血$CD4^+IL\text{-}17^+$ Th17细胞比例升高，$CD4^+CD25^+Foxp^{3+}$ Treg细胞比例降低；与CLP组相比，VD_3组小鼠外周血$CD4^+IL\text{-}17^+$ Th17细胞比例降低，$CD4^+CD25^+Foxp^{3+}$ Treg细胞比例升高，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图2A。

ELISA结果显示，与假手术组相比，CLP组小鼠血清中IL-17水平升高，IL-10水平降低；与CLP组相比，VD_3组小鼠血清中IL-17水平降低，IL-10水平升高，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图2B。

2.3　VD_3对脓毒症AKI小鼠肾组织维生素D受体（vitamin D receptor，VDR）和NLRP6蛋白表达的影响

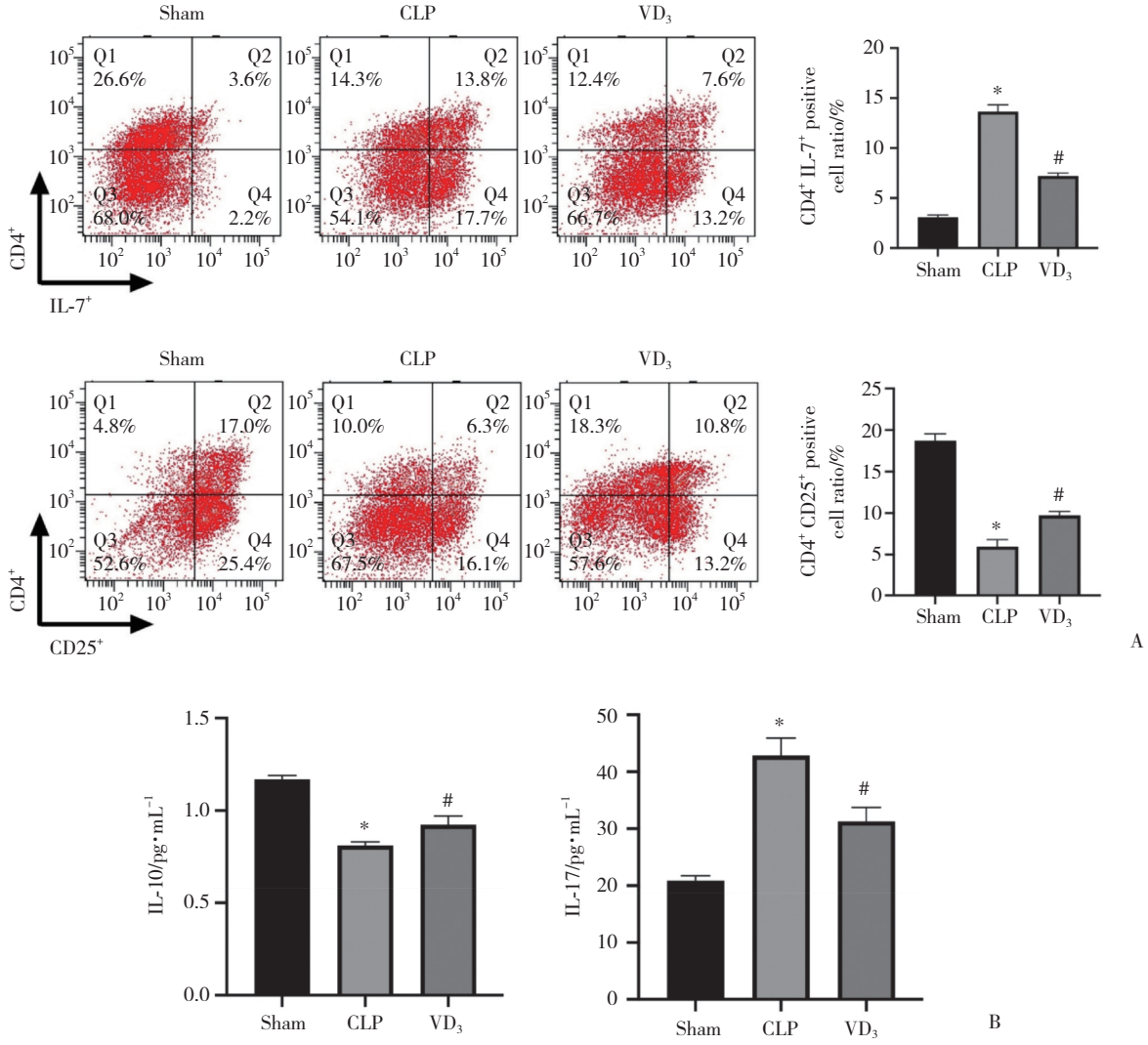
Western blotting结果显示，与假手术组相比，CLP组小鼠肾组织中VDR和NLRP6蛋白表达水平降低；与CLP组相比，VD_3组小鼠肾组织中VDR和NLRP6蛋白表达水平升高，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图3。

2.4　敲减*NLRP6*对VD_3治疗的脓毒症AKI小鼠外周血Th17/Treg细胞平衡的影响

Western blotting结果显示，与VD_3+sh-NC组小鼠相比，VD_3+sh-NLRP6组小鼠肾组织中NLRP6蛋白表达水平降低；流式细胞术检测结果显示，与VD_3+sh-NC组小鼠相比，VD_3+sh-NLRP6组小鼠外周血$CD4^+IL\text{-}17^+$ Th17细胞比例升高，$CD4^+CD25^+Foxp^{3+}$ Treg细胞比例降低；ELISA检测结果显示，与VD_3+sh-NC

组小鼠相比，VD_3+sh-NLRP6组小鼠血清中IL-17水平升高，IL-10水平降低（均$P<0.05$）。见图4。

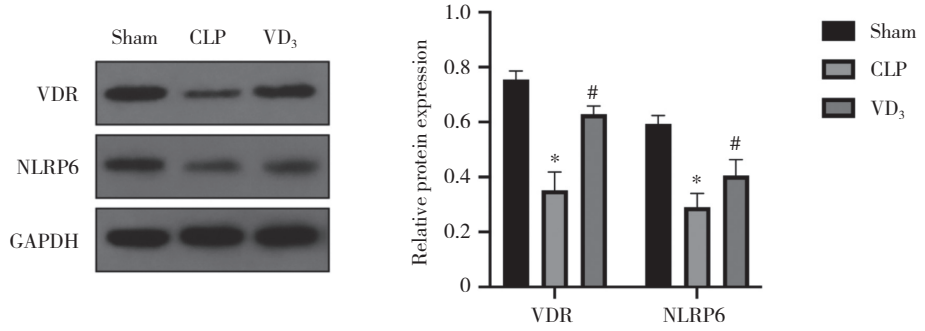
2.5　敲减*NLRP6*对VD_3治疗的脓毒症AKI小鼠肾损伤的影响



A，Th17/Treg cell ratio in peripheral blood detected by flow cytometry；B，IL-17 and IL-10 levels in serum detected by ELISA.* $P<0.05$ vs. sham group；# $P<0.05$ vs. CLP group.

图2　VD_3对脓毒症AKI小鼠Th17/Treg细胞失衡的影响

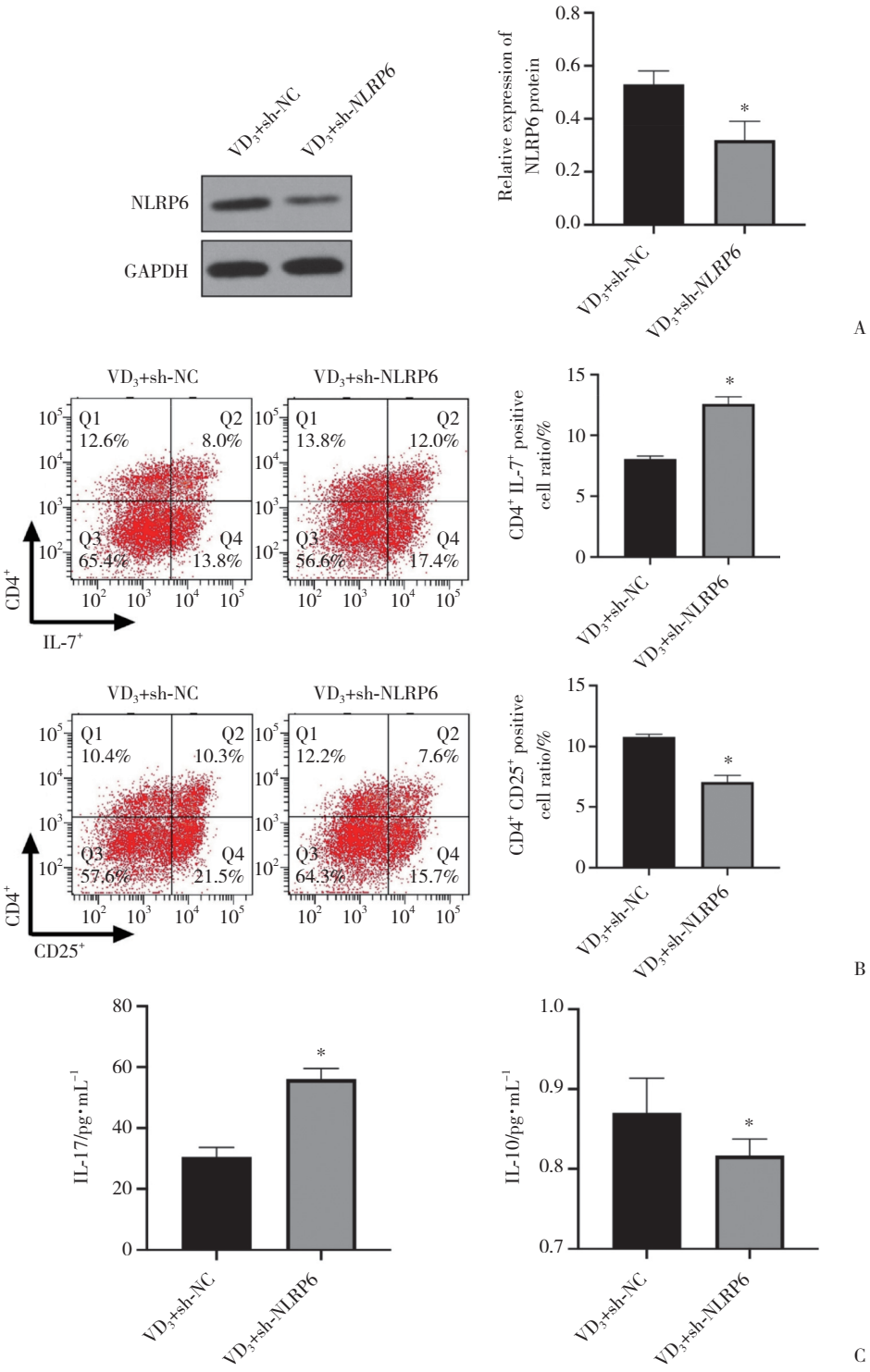
Fig.2　Effects of VD_3 on Th17/Treg cell imbalance of mice with sepsis induced AKI



* $P<0.05$ vs. sham group；# $P<0.05$ vs. CLP group.

图3　VD_3对脓毒症AKI小鼠肾组织VDR和NLRP6蛋白表达的影响

Fig.3　Effects of VD_3 on the expression of VDR and NLRP6 in renal tissue of mice with sepsis induced AKI

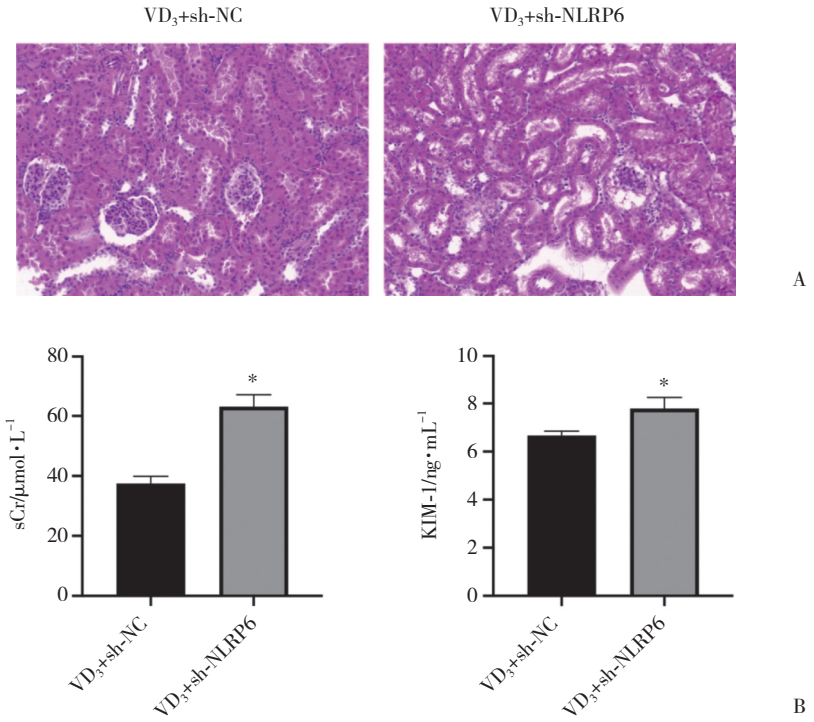


A, expression of NLRP6 protein detected using Western blotting; B, ratio of Th17/Treg cells in peripheral blood detected using flow cytometry; C, levels of IL-17 and IL-10 in serum detected using ELISA. *$P < 0.05$ vs. VD_3+sh-NC group.

图4　敲减*NLRP6*对VD_3治疗的脓毒症AKI小鼠外周血Th17/Treg细胞平衡的影响

Fig.4　Effects of knockdown of *NLRP6* on Th17/Treg cell balance in peripheral blood of sepsis induced AKI mice treated with VD_3

HE染色结果显示，VD_3+sh-NC组小鼠肾组织病理损伤较轻，肾组织结构较完整，间质内出血和浸润的炎症细胞较少；VD_3+sh-NLRP6组小鼠肾组织损伤加重，间质内可见明显出血和大量浸润的炎症细胞，见图5A。ELISA结果显示，与VD_3+sh-NC组相比，VD_3+sh-NLRP6组小鼠血清sCr和KIM-1水平升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见图5B。



A, HE staining results (×200); B, sCr and KIM-1 levels detected using ELISA. *$P<0.05$ vs. VD_3+sh-NC group.

图5　敲减*NLRP6*对VD_3治疗的脓毒症AKI小鼠肾损伤的影响

Fig.5　Effect of knockdown *NLRP6* on renal injury of septic induced AKI mice treated with vitamin D_3

3　讨论

维生素D可促进巨噬细胞吞噬作用[8]，调节单个核细胞免疫功能，减少炎性细胞因子产生，还能增强紧密连接，并降低对肠黏膜屏障损伤和感染的易感性[6]。研究[6]表明，维生素D在肾脏中活化，AKI会导致VD_3的产生减少。还有研究[9]发现，VD_3通过抑制核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）激活改善脂多糖诱导的AKI。本研究发现，CLP组小鼠肾小管上皮细胞水肿且体积变大，肾小球结构紊乱，间质内可见明显出血和大量炎症细胞浸润，小鼠血清中sCr和KIM-1水平升高，说明脓毒症AKI模型建立成功。本研究还发现，给予VD_3后，小鼠肾组织病理损伤减轻，肾组织结构较完整，间质内出血和浸润的炎症细胞较少，血清中sCr和KIM-1水平降低，表明给予VD_3可改善脓毒症诱导的AKI。

Th17细胞是一类特殊的可分泌IL-17的$CD4^+$ T淋巴细胞亚群，其核心特征表现为特异性高表达维甲酸相关孤儿受体γt这一关键转录调控因子。这类细胞能分泌IL-17A和IL-17F作为主要效应分子，同时还能产生IL-21、IL-22等多种促炎性细胞因子[10]。Treg细胞是具有维持免疫稳态和限制过度免疫反应功能的$CD4^+$ T细胞，其主要转录因子为Foxp，Treg细胞能分泌IL-10和转化生长因子β1等抗炎细胞因子，可抑制幼稚T细胞活化，并防止效应T细胞过度激活[11]。脓毒症相关AKI的发展常伴随IL-17的过度释放和Th17细胞的组织浸润，抑制Th17细胞分化和功能可显著减轻炎症反应引起的AKI[12]。此外，Treg细胞在肾缺血再灌注模型和药物诱导的肾损伤模型中发挥肾脏保护作用[13]。最近的一项前瞻性研究[14]发现，与未发生脓毒症AKI的患者相比，发生脓毒症AKI的患者Th17/Treg细胞比值升高，Th17/Treg细胞失衡与脓毒症患者AKI的发生和严重程度相关，Th17/Treg细胞比值可能是脓毒症AKI的潜在预测指标。本研究发现，CLP组小鼠外周血Th17细胞比例和血清中IL-17水平均升高，外周血Treg细胞比例和血清中IL-10水平均降低，给予VD_3后，小鼠外周血Th17细胞比例和血清中IL-17水平降低，外周血Treg细胞比例和血清中IL-10水平升高。表明给予VD_3能够改善脓毒症AKI小鼠Th17/Treg细胞失衡。

VD_3可通过激活VDR发挥作用[15]，该受体是一种配体依赖性核转录因子，与VD_3结合并调节下游

基因转录，以发挥多种功能[16-17]。NLRP6是核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白家族的新成员，可抑制先天免疫相关的信号通路激活[15,18]。NLRP6缺乏可促进肾组织中细胞外信号调节激酶1/2和p38丝裂原活化蛋白激酶磷酸化，从而造成严重的AKI和肾脏炎症[15]。有研究[16]发现，NLRP6表达受VDR调节。此外，上调NLRP6表达能增加Treg细胞比例，降低Th17细胞比例[19]。本研究发现，VDR和NLRP6在CLP组小鼠肾组织中表达下调，给予VD_3可增加CLP小鼠肾组织中VDR和NLRP6表达，表明VD_3可能通过激活VDR上调NLRP6表达。此外，本研究还发现，敲减*NLRP6*逆转了给予VD_3对CLP小鼠Th17/Treg细胞失衡的改善作用以及对肾损伤的保护作用，提示给予VD_3可能通过VDR/NLRP6改善脓毒症诱导的Th17/Treg细胞失衡和AKI。

综上所述，本研究结果显示，VD_3对脓毒症诱导的AKI起保护作用，其机制可能与激活VDR上调NLRP6并改善Th17/Treg细胞失衡有关。总之，VD_3可能作为改善脓毒症AKI的有效治疗药物。

参考文献：

[1] 戴胜凌，汪贵庆，邵晓洁，等. 白芍总苷调控细胞焦亡对脓毒症大鼠急性肺损伤的保护机制[J]. 解剖科学进展，2024，30(1)：4-8. DOI：10.16695/j.cnki.1006-2947.2024.01.002.

[2] MANRIQUE-CABALLERO CL，DEL RIO-PERTUZ G，GOMEZ H. Sepsis-associated acute kidney injury[J]. Crit Care Clin，2021，37(2)：279-301. DOI：10.1016/j.ccc.2020.11.010.

[3] PAIS T，JORGE S，LOPES JA. Acute kidney injury in sepsis[J]. Int J Mol Sci，2024，25(11)：5924. DOI：10.3390/ijms25115924.

[4] KUMAR V. T cells and their immunometabolism：a novel way to understanding sepsis immunopathogenesis and future therapeutics[J]. Eur J Cell Biol，2018，97(6)：379-392. DOI：10.1016/j.ejcb.2018.05.001.

[5] XIA HF，WANG FQ，WANG M，et al. Maresin1 ameliorates acute lung injury induced by sepsis through regulating Th17/Treg balance[J]. Life Sci，2020，254：117773. DOI：10.1016/j.lfs.2020.117773.

[6] CHANG YM，CHOU YT，KAN WC，et al. Sepsis and acute kidney injury：a review focusing on the bidirectional interplay[J]. Int J Mol Sci，2022，23(16)：9159. DOI：10.3390/ijms23169159.

[7] DAI Q，ZHANG H，TANG SQ，et al. Vitamin D-VDR (vitamin D receptor) alleviates glucose metabolism reprogramming in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury[J]. Front Physiol，2023，14：1083643. DOI：10.3389/fphys.2023.1083643.

[8] FERNANDEZ G J，RAMÍREZ-MEJÍA J M，URCUQUI-INCHIMA S. Vitamin D boosts immune response of macrophages through a regulatory network of microRNAs and mRNAs[J]. J Nutr Biochem，2022，109：109105. DOI：10.1016/j.jnutbio.2022.109105.

[9] DU J，JIANG SQ，HU ZX，et al. Vitamin D receptor activation protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury through suppression of tubular cell apoptosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol，2019，316(5)：F1068-F1077. DOI：10.1152/ajprenal.00332.2018.

[10] ZHANG SW，GANG XK，YANG S，et al. The alterations in and the role of the Th17/treg balance in metabolic diseases[J]. Front Immunol，2021，12：678355. DOI：10.3389/fimmu.2021.678355.

[11] SANTAMARIA JC，BORELLI A，IRLA M. Regulatory T cell heterogeneity in the thymus：impact on their functional activities[J]. Front Immunol，2021，12：643153. DOI：10.3389/fimmu.2021.643153.

[12] LUO CJ，LUO F，MAN XF，et al. Mesenchymal stem cells attenuate sepsis-associated acute kidney injury by changing the balance of Th17 cells/tregs via Gal-9/Tim-3[J]. Curr Stem Cell Res Ther，2023，18(4)：540-550. DOI：10.2174/1574888X176662205111513 43.

[13] SHARMA R，KINSEY GR. Regulatory T cells in acute and chronic kidney diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol，2018，314(5)：F679-F698. DOI：10.1152/ajprenal.00236.2017.

[14] ZHOU X，YAO JY，LIN J，et al. Th17/regulatory T-cell imbalance and acute kidney injury in patients with sepsis[J]. J Clin Med，2022，11(14)：4027. DOI：10.3390/jcm11144027.

[15] SÎRBE C，REDNIC S，GRAMA A，et al. An update on the effects of vitamin D on the immune system and autoimmune diseases[J]. Int J Mol Sci，2022，23(17)：9784. DOI：10.3390/ijms23179784.

[16] GAO HL，ZHOU H，ZHANG ZQ，et al. Vitamin D_3 alleviates inflammation in ulcerative colitis by activating the VDR-NLRP6 signaling pathway[J]. Front Immunol，2023，14：1135930. DOI：10.3389/fimmu.2023.1135930.

[17] VON ESSEN MR，KONGSBAK M，SCHJERLING P，et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells[J]. Nat Immunol，2010，11(4)：344-349. DOI：10.1038/ni.1851.

[18] SÎRBE C，REDNIC S，GRAMA A，et al. An update on the effects of vitamin D on the immune system and autoimmune diseases[J].Int J Mol Sci，2022，23(17)：9784. DOI：10.3390/ijms23179784.

[19] CHENG C，HU JY，LI YN，et al. Qing-Chang-Hua-Shi granule ameliorates DSS-induced colitis by activating NLRP6 signaling and regulating Th17/Treg balance[J]. Phytomedicine，2022，107：154452. DOI：10.1016/j.phymed.2022.154452.

（编辑　王又冬）