doi：10.7499/j.issn.1008-8830.2509086

论著·实验研究

粪菌移植通过抑制RIPK1/RIPK3改善小鼠异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病胃肠道炎症反应的机制研究

李玥[1] 牛昊书[2] 陆雪莉[1] 李雪春[1] 肖敏[1] 王英[1] 杨少静[1] 郭玉宇[1] 孙妍[1]

（1. 内蒙古医科大学第三临床医学院儿科，内蒙古包头 014010；
2. 内蒙古医科大学第三临床医学院消化内科，内蒙古包头 014010）

［摘要］**目的** 探讨粪菌移植（fecal microbiota transplantation, FMT）改善小鼠异基因造血干细胞移植（allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT）后急性移植物抗宿主病（acute graft-versus-host disease, aGVHD）胃肠道炎症反应的分子机制。**方法** 建立小鼠aGVHD模型，将BALB/c小鼠随机分为空白对照组、骨髓移植组、aGVHD模型组、FMT治疗组，每组6只。通过组织病理学检查观察各组小鼠组织病理学损伤情况，采用免疫组织化学检测受体相互作用蛋白激酶（receptor-interacting protein kinase, RIPK）1、RIPK3、混合谱系激酶结构域样蛋白（mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL）表达，Western blot法检测RIPK1、RIPK3、MLKL、磷酸化RIPK1（phosphorylated RIPK1, p-RIPK1）、磷酸化MLKL（phosphorylated MLKL, p-MLKL）蛋白表达水平，酶联免疫吸附试验检测血浆中再生胰岛衍生蛋白3α（regenerating islet-derived protein 3 alpha, Reg3α）含量。通过16S rRNA基因测序对肠道菌群进行分析。**结果** 与aGVHD模型组相比，FMT治疗组厚壁菌门、拟杆菌门相对丰度升高，变形菌门相对丰度降低；小鼠体重下降趋势明显缓解，死亡发生时间延缓。与aGVHD模型组相比，FMT治疗组α多样性指数（Simpson, Pielou, Shannon）升高（$P<0.05$），肠道病理评分和RIPK1、RIPK3、MLKL表达及RIPK1、RIPK3、MLKL、p-RIPK1、p-MLKL蛋白表达水平、血浆Reg3α水平显著降低（$P<0.05$）。**结论** FMT可能通过重建肠道菌群平衡，抑制RIPK1/RIPK3介导的坏死性凋亡通路，减轻aGVHD胃肠道炎症反应。［中国当代儿科杂志，2026，28（5）：598-606］

［关键词］急性移植物抗宿主病；粪菌移植；RIPK1/RIPK3；肠道菌群；小鼠

Fecal microbiota transplantation attenuates gastrointestinal inflammation in murine acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by inhibiting RIPK1/RIPK3-mediated necroptosis

LI Yue, NIU Hao-Shu, LU Xue-Li, LI Xue-Chun, XIAO Min, WANG Ying, YANG Shao-Jing, GUO Yu-Yu, SUN Yan. Department of Pediatrics, The Third Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University, Baotou, Inner Mongolia 014010, China (Sun Y, Email: 18147216564@163.com)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which fecal microbiota transplantation (FMT) alleviates gastrointestinal inflammation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) in murine acute graft-versus-host disease (aGVHD). **Methods** A murine aGVHD model after allo-HSCT was established, and BALB/c mice were randomly assigned to blank control, bone marrow transplantation, aGVHD model, and FMT treatment groups (n=6 per group). Disease severity was assessed by histopathology. Expression of receptor-interacting protein kinase (RIPK)1, RIPK3, and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) was evaluated by immunohistochemistry. Protein levels of RIPK1, RIPK3, MLKL, phosphorylated RIPK1 (p-RIPK1), and phosphorylated MLKL (p-MLKL) were determined by Western blotting. Plasma regenerating islet-derived protein 3 alpha (Reg3α) was

［收稿日期］2025-09-17；［接受日期］2026-03-04
［基金项目］内蒙古医学科学院一般项目（2024GLLH0631）。
［作者简介］李玥，女，硕士研究生。
［通信作者］孙妍，女，副教授。Email：18147216564@163.com。

measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The intestinal microbiota was profiled by 16S rRNA gene sequencing. **Results** Compared with the aGVHD model group, the FMT group showed higher relative abundances of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and a lower relative abundance of *Proteobacteria*; body weight loss was markedly attenuated, and survival time was prolonged. Alpha-diversity indices (Simpson, Pielou, Shannon) increased in the FMT group (P<0.05). Intestinal pathology scores, expression of RIPK1, RIPK3, and MLKL, protein levels of RIPK1, RIPK3, MLKL, p-RIPK1, and p-MLKL, and plasma Reg3α levels were significantly reduced in the FMT group versus the aGVHD model group (all P<0.05). **Conclusions** FMT may attenuate gastrointestinal inflammation in aGVHD by restoring intestinal microbial balance and inhibiting the RIPK1/RIPK3-mediated necroptosis pathway.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2026, 28(5): 598-606]

Key words: Fecal microbiota transplantation; Acute graft-versus-host disease; RIPK1/RIPK3; Intestinal microbiota; Mouse

急性移植物抗宿主病（acute graft-versus-host disease, aGVHD）是异基因造血干细胞移植（allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT）后最严重的并发症之一，严重影响患者的生活质量和长期生存预后[1]。儿科血液肿瘤患者aGVHD发生率达40%~60%，其中胃肠道aGVHD是最常见的表现形式，也是导致移植相关死亡的主要原因[2]。传统的免疫抑制治疗虽可一定程度上控制aGVHD的进展，但是儿童免疫系统尚未发育成熟，治疗选择更加有限[3]。

近年来，粪菌移植（fecal microbiota transplantation, FMT）作为一种新兴的微生态治疗手段受到了广泛关注[4]。已有研究表明，allo-HSCT后患者肠道菌群多样性显著降低，双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌丰度减少，肠杆菌科等条件致病菌增加，这种菌群失调与aGVHD的发生发展密切相关[5]。FMT可通过重建肠道菌群结构、恢复肠道屏障功能、调节免疫反应，在炎症性肠病、艰难梭菌感染等疾病治疗中展现出良好的疗效[6]。近年来研究发现，受体相互作用蛋白激酶（receptor-interacting protein kinase, RIPK）1相关信号通路参与aGVHD肠道组织损伤，抑制RIPK1可改善免疫重建并降低GVHD病死率，提示RIPK1/RIPK3介导的程序性坏死通路是aGVHD胃肠道损伤的重要干预靶点[7]。此外，肠道菌群失调被认为是aGVHD发生发展的重要机制之一，FMT等微生态干预可通过重建肠道菌群稳态减轻GVHD相关肠道损伤[8]。基于此，本研究通过构建小鼠aGVHD模型，探讨FMT改善胃肠道炎症反应的分子机制，为儿科aGVHD患者的治疗提供新的理论依据和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用7周龄、体重20~22 g的雌性C57BL/6小鼠作为供体，7周龄、体重20~22 g的雌性BALB/c小鼠作为受体。实验动物购自北京迈德康纳生物技术有限公司，动物生产许可证号为SYXK（京）2023-0062。所有实验动物饲养于内蒙古医科大学医学院SPF级动物实验中心。本研究实验方案获内蒙古包钢医院伦理委员会批准，批准号为2024-MER-160。

将24只BALB/c小鼠随机分为4组，每组6只。空白对照组常规饲养，不进行移植及干预处理；骨髓移植组仅移植骨髓细胞，移植24 h后每日灌胃PBS 500 μL；aGVHD模型组移植骨髓细胞和脾细胞，移植24 h后起每日灌胃PBS 500 μL；FMT治疗组在建立aGVHD模型后，于移植24 h后每日灌胃粪菌移植液500 μL，每日2次。

1.2 aGVHD模型建立

参照文献［9］方法并加以改进，建立小鼠aGVHD模型。取C57BL/6供体小鼠，无菌条件下分离脾脏和骨髓组织。脾脏经机械研磨、75 μm细胞筛过滤，红细胞裂解后用PBS洗涤，调整脾细胞浓度至5×10^7/mL；骨髓细胞通过冲洗双侧股骨和胫骨获得，经滤网过滤、PBS洗涤后，调整浓度至1×10^8/mL。

BALB/c受体小鼠于移植前接受8.0 Gy单次全身γ射线照射，随后经尾静脉注射细胞悬液。骨髓移植组每只小鼠注射骨髓细胞1×10^7个；aGVHD模型组和FMT治疗组每只小鼠注射骨髓细胞1×10^7个联合脾细胞5×10^6个。移植操作在无菌条件下完成，术后小鼠置于SPF级环境饲养，持续观察aGVHD相关表现。体重降至初始体重75%以下的小鼠记为死亡并实施安乐死。死亡小鼠当日立即取材，其余存活小鼠于骨髓移植后第15天统一安乐死并采集组织样本。

1.3 FMT的制作

空白对照组小鼠当日新鲜粪便颗粒立即收集后置于−80°C保存。按每份50~100 mg粪便加入

1 mL无菌PBS制备菌群悬液，冰浴条件下匀浆，去除粗大颗粒，静置后取上清液作为FMT液，现配现用。FMT自骨髓移植术后第5天开始，每日灌胃新鲜制备的移植液500 μL，连续5 d。灌胃前小鼠禁食2 h，灌胃后单笼饲养以避免交叉干扰。

1.4 组织病理学检查

死亡小鼠立即剖检取小肠组织，于胃幽门下约15 cm截取小肠，4%多聚甲醛固定48 h，常规石蜡包埋，制备厚度4 μm切片，行苏木精–伊红染色。光学显微镜下观察肠组织病理学改变并进行评分：0分，组织结构正常；1~2分，轻度隐窝细胞坏死及轻度炎性细胞浸润；3~5分，中度隐窝细胞坏死并伴不同程度固有层炎性细胞浸润；6~8分，重度隐窝细胞坏死，黏膜层广泛剥脱并伴杯状细胞明显丢失。

1.5 肠道菌群16S rRNA测序分析

因部分小鼠粪便样本量不足或质量不达标，每组仅筛选样本充足且测序质量合格的4只小鼠纳入16S rRNA测序分析。由上海派诺森生物科技有限公司完成测序。提取样本总DNA，扩增16S rRNA基因V3~V4区域并进行高通量测序。原始测序数据经QIIME2平台分析，采用DADA2算法完成质量控制、序列去噪、拼接及嵌合体去除，获得高质量特征序列。物种注释基于Silva数据库完成。α多样性采用Shannon指数、Simpson指数及Pielou均匀度指数评估；β多样性基于Bray-Curtis距离矩阵，结合主坐标分析和非度量多维尺度分析进行分析。样本间相似性采用非加权组平均法层次聚类分析评估。

1.6 免疫组织化学检测

石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后，用3% H_2O_2室温孵育20 min阻断内源性过氧化物酶活性，PBS洗涤。随后以10%山羊血清于37℃封闭30 min，加入RIPK1、RIPK3（1∶300）及混合谱系激酶结构域样蛋白（mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL）（1∶1 000）一抗，4℃孵育过夜。PBS洗涤后，加入HRP标记二抗于37℃孵育1 h。PBS洗涤后经DAB显色、苏木精复染、盐酸乙醇分化、返蓝，梯度乙醇脱水、二甲苯透明并封片。使用Image-Pro Plus软件分析图像并计算目标蛋白的平均光密度值。

1.7 Western blot检测

小肠组织匀浆提取总蛋白，使用BCA法（北京索莱宝科技有限公司）定量。12% SDS-PAGE电泳分离蛋白，转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h，分别孵育磷酸化MLKL（phosphorylated MLKL, p-MLKL）（1∶1 000）、MLKL抗体（1∶1 000）、磷酸化RIPK1（phosphorylated RIPK1, p-RIPK1）抗体（1∶1 000）、RIPK1抗体（1∶1 000）、RIPK3抗体（1∶1 000），4℃过夜。GAPDH抗体（1∶5 000）作为内参。HRP标记二抗室温孵育1 h，ECL发光液孵育后成像分析。

1.8 血浆再生胰岛衍生蛋白3α水平检测

于末次FMT治疗后24 h、小鼠处死前，采用眼眶采血法收集外周全血，分离血浆后收集上清，–80℃保存。使用再生胰岛衍生蛋白3α（regenerating islet-derived protein 3 alpha, Reg3α）ELISA试剂盒（武汉基因美科技有限公司）检测血浆Reg3α浓度，按照试剂盒说明书操作。使用BioTek酶标仪测定各孔450 nm处吸光度，根据标准曲线计算血浆Reg3α浓度。

1.9 统计学分析

采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验；不符合正态分布的计量资料以中位数（四分位数间距）[M（P_{25}，P_{75}）]表示，多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验，组间两两比较采用Dunn-Bonferroni法校正。小鼠不同时间点体重变化率采用混合效应模型分析，各时间点组间事后多重比较采用Sidak法。生存率采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线，组间总体生存差异采用log-rank检验；组间两两比较采用log-rank（Mantel-Cox）检验，并采用Bonferroni法校正多重比较误差。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FMT对aGVHD小鼠肠道菌群的调节作用

16S rRNA测序分析显示，在门水平上，与空白对照组相比，aGVHD模型组厚壁菌门A［12.75（9.80，16.20）% vs 9.41（8.90，10.10）%］相对丰度差异无统计学意义（P>0.05），厚壁菌门B［29.12（18.70，39.60）% vs 11.47（4.50，18.30）%］、拟杆菌门［43.56（30.10，56.90）% vs 17.30（5.80，28.70）%］相对丰度降低（P<0.05），变形菌门［1.47（0.30，2.60）% vs 68.94（57.20，80.60）%］相对丰度升高（P<0.05）。与

aGVHD 模型组比较，骨髓移植组厚壁菌门 A［16.90（7.20，32.50）%］、厚壁菌门 B［17.10（6.30，33.90）%］相对丰度差异无统计学意义（*P*>0.05），拟杆菌门［48.80（29.50，68.10）%］相对丰度升高（*P*<0.05），变形菌门［0.30（0.00，0.80）%］相对丰度降低（*P*<0.05）；FMT 治疗组厚壁菌门 A［29.90（15.70，47.30）%］、厚壁菌门 B［31.00（16.20，48.80）%］较 aGVHD 模型组相对丰度升高（*P*<0.05），拟杆菌门［35.20（19.70，52.00）%］相对丰度升高（*P*<0.05），变形菌门［12.10（1.20，24.50）%］相对丰度降低（*P*<0.05）（图 1A）。

α 多样性分析显示，与空白对照组相比，aGVHD 模型组小鼠肠道菌群的 Simpson 指数、Pielou 均匀度指数和 Shannon 指数均降低（*P*<0.05）；与 aGVHD 模型组相比，FMT 治疗组上述 α 多样性指数均升高（*P*<0.05）（图 1B）。主成分分析结果显示，空白对照组与 aGVHD 模型组样本在主成分空间中明显分离，骨髓移植组和 FMT 治疗组样本分布介于两组之间，其中 FMT 治疗组菌群结构更接近空白对照组（图 1C）。

层次聚类分析显示，aGVHD 模型组 4 个样本组内菌群结构高度相似聚为一支；空白对照组与骨髓移植组样本聚类距离更近，菌群组成相似度更高；FMT 治疗组样本单独形成独立大支，菌群结构介于正常对照组与模型组之间。在属水平上，与空白对照组相比，aGVHD 模型组有益菌乳杆菌属［9.16（3.31，15.01）% vs 2.60（1.20，4.00）%］相对丰度降低（*P*<0.05），利吉乳杆菌属［0.13（0.11，0.15）% vs 0.09（0.07，0.11）%］相对丰度差异无统计学意义（*P*>0.05），阿利斯特菌属 A［3.13（0.77，5.49）% vs 0.63（0.24，1.02）%］相对丰度降低（*P*<0.05），条件致病菌大肠埃希菌属［8.26（0.34，16.18）% vs 7.65（7.11，8.19）%］相对丰度差异无统计学意义（*P*>0.05），条件致病菌相关的 CAG-485［0.15（0.12，0.18）% vs 73.18（72.09，74.27）%］相对丰度升高（*P*<0.05）。与 aGVHD 模型组相比，FMT 治疗组乳杆菌属［22.74（19.58，25.90）%］、利吉乳杆菌属［11.89（10.17，13.61）%］、阿利斯特菌属 A［8.61（7.36，9.86）%］相对丰度升高（*P*<0.05），大肠埃希菌属［3.21（0.85，5.57）%］、CAG-485［12.07（9.93，14.21）%］相对丰度降低（*P*<0.05）（图 1D）。

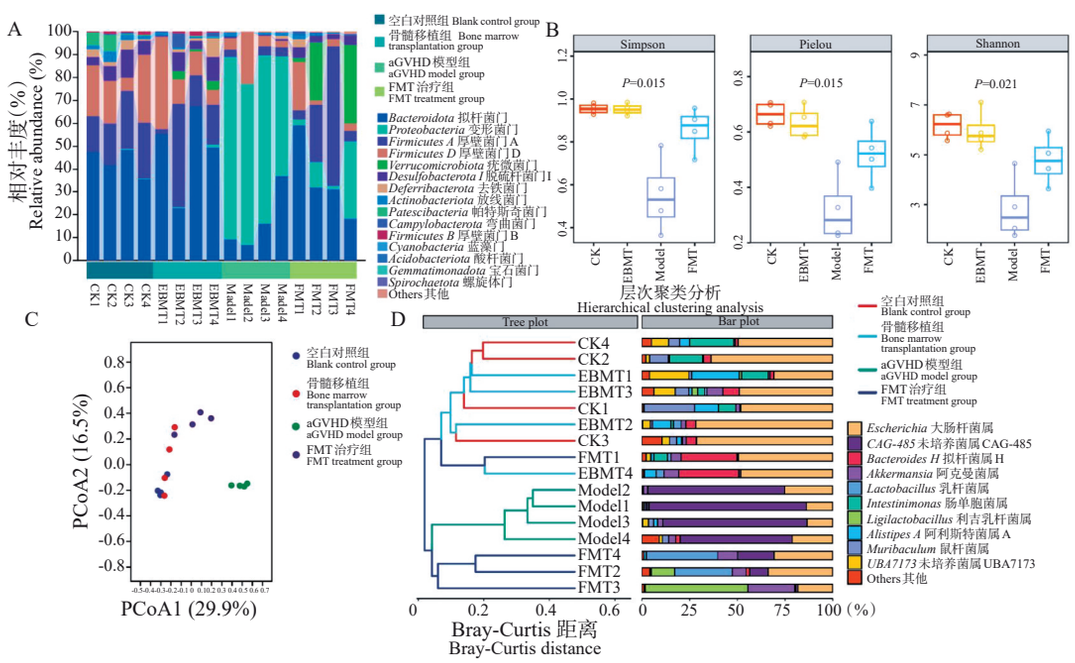


图 1　FMT 对 aGVHD 小鼠肠道菌群的调节作用　A：各组小鼠肠道菌群在门水平的相对丰度；B：各组小鼠肠道菌群 α 多样性指数比较，包括 Simpson 指数、Pielou 指数和 Shannon 指数；C：基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析（PCoA），评估各组小鼠肠道菌群 β 多样性差异。各点代表单个样本，不同颜色表示不同组别，样本间距离反映肠道菌群群落结构差异，距离越近表示菌群组成越相似；D：基于肠道菌群组成的层次聚类分析（左）及属水平相对丰度分布（右）。［CK］空白对照组；［EBMT］骨髓移植组；［Model］aGVHD 模型组；［FMT］FMT 治疗组。

2.2 FMT 对 aGVHD 小鼠肠道组织病理学损伤的保护作用

空白对照组结肠组织结构完整，黏膜层连续；骨髓移植组结肠组织出现轻度损伤，表现为部分上皮细胞脱落、少量隐窝坏死消失及轻度炎性细胞浸润，但整体结构尚完整；aGVHD 模型组结肠组织损伤最为严重，黏膜广泛性溃疡形成，上皮细胞几乎完全脱落，隐窝大面积坏死消失，并伴显著炎性细胞浸润及杯状细胞几乎完全缺失；FMT 组结肠组织呈中度损伤，局部黏膜溃疡形成，上皮细胞明显脱落，隐窝结构受损，伴较多炎性细胞浸润及杯状细胞减少（图 2）。肠道病理评分结果显示，aGVHD 模型组病理评分（8 ± 0）高于空白对照组（0 ± 0）（P<0.05）；骨髓移植组（2.0 ± 0.8）、FMT 治疗组（5.7 ± 0.5）病理评分低于 aGVHD 模型组（P<0.05）。

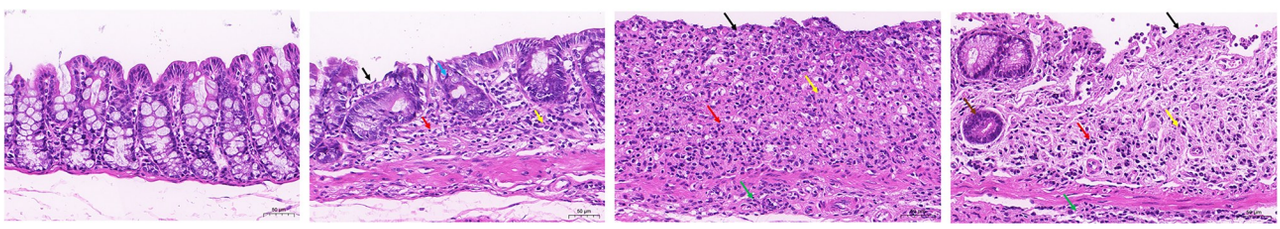


图 2　各组小鼠小肠组织 HE 染色结果比较　箭头指示典型病理改变。黑色箭头示上皮细胞脱落，黄色箭头示肉芽组织增生，蓝色箭头示杯状细胞减少，红色箭头示炎性细胞浸润，绿色箭头示固有层或黏膜下层炎性细胞浸润，棕色箭头示隐窝坏死或结构不规则。

2.3 FMT 对 aGVHD 小鼠临床症状的改善作用

空白对照组小鼠体重随时间呈稳步上升；骨髓移植组小鼠移植早期体重轻度下降，整体相对稳定；aGVHD 模型组小鼠体重持续下降，第 7 天后下降加快，出现活动减少、弓背、竖毛、皮肤损伤及腹泻等典型 aGVHD 临床症状；FMT 治疗组小鼠体重下降幅度较 aGVHD 模型组明显减缓，自第 5 天起体重曲线与模型组分离，第 9、11 天体重显著高于 aGVHD 模型组（P<0.05）（图 3A）。生存分析结果显示，空白对照组小鼠全程无死亡，生存率为 100%；FMT 治疗组（第 13~14 天）和骨髓移植组小鼠（第 11~14 天）死亡时间较 aGVHD 模型组（第 6~13 天）延后。Kaplan-Meier 生存曲线及 log-rank 检验结果显示，与 aGVHD 模型组相比，骨髓移植组、FMT 治疗组生存时间显著延长（分别 χ^2=4.209，P=0.410；χ^2=6.487，P=0.011）；FMT 治疗组与骨髓移植组比较生存时间差异无统计学意义（χ^2=0.038，P=0.846）（图 3B）。

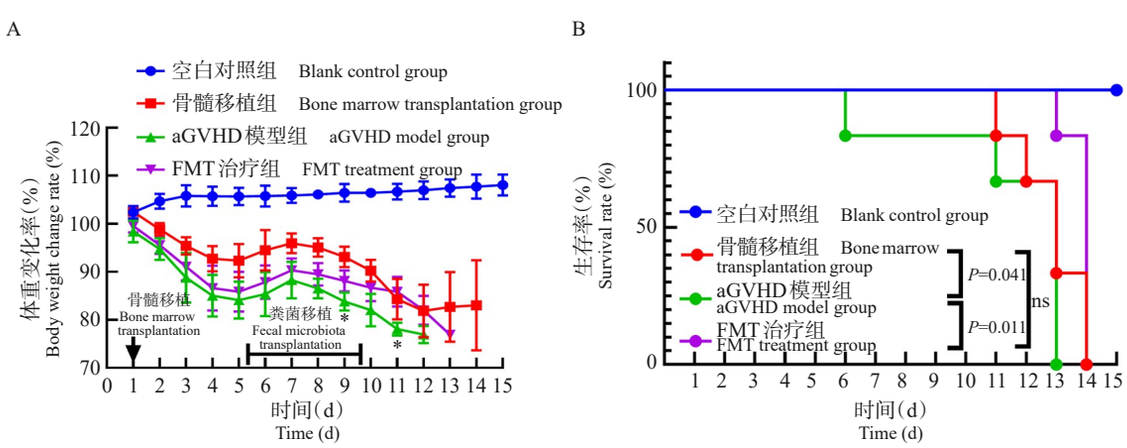


图 3　FMT 对 aGVHD 小鼠临床症状和生存率的改善作用　A：各组小鼠体重变化率曲线；B：各组小鼠生存曲线。*表示 aGVHD 模型组与 FMT 治疗组相比，P<0.05。ns 代表差异无统计学意义。

2.4 FMT 对 RIPK1/RIPK3/MLKL 蛋白表达的调节作用

免疫组织化学结果显示，aGVHD 模型组 RIPK1、RIPK3、MLKL 表达水平高于空白对照组（P<0.05）；骨髓移植组上述蛋白表达水平较空白对照组升高（P<0.05），较 aGVHD 模型组降低（P<0.05）。FMT 治疗组上述蛋白表达水平较 aGVHD 模型组降低（P<0.05），较空白对照组、骨髓移植组升高（P<0.05）。见图 4、表 1。

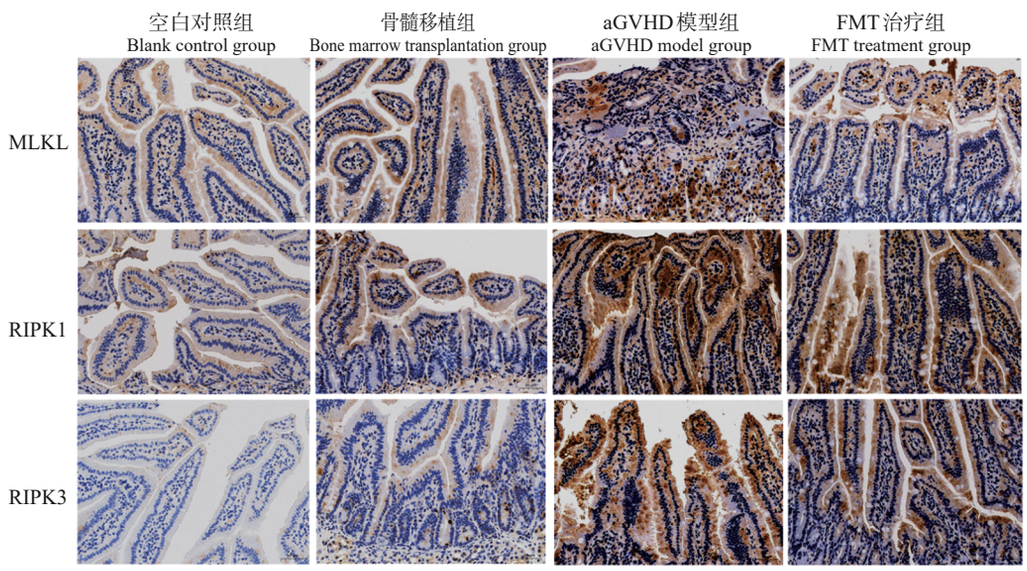


图 4　各组小鼠小肠组织 MLKL、RIPK1、RIPK3 蛋白免疫组织化学染色结果比较　aGVHD 模型组 MLKL、RIPK1、RIPK3 表达较空白对照组升高，呈弥漫性强阳性分布；骨髓移植组上述蛋白表达较对照组升高，较 aGVHD 模型组降低；FMT 治疗组上述蛋白表达较 aGVHD 模型组降低，但仍高于空白对照组。棕黄色为 DAB 阳性显色，代表 MLKL、RIPK1、RIPK3 蛋白的阳性表达；蓝色为苏木精复染标记细胞核。

表 1　各组小鼠小肠组织 MLKL、RIPK1、RIPK3 平均光密度值比较　（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	MLKL	RIPK1	RIPK3
空白对照组	0.172 ± 0.012	0.149 ± 0.009	0.167 ± 0.022
骨髓移植组	0.194 ± 0.012[a]	0.174 ± 0.017[a]	0.205 ± 0.012[a]
aGVHD 模型组	0.323 ± 0.025[b]	0.235 ± 0.013[b]	0.312 ± 0.027[b]
FMT 治疗组	0.251 ± 0.018[a,b,c]	0.202 ± 0.019[a,b,c]	0.259 ± 0.014[a,b,c]
F 值	58.75	21.37	32.67
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：［MLKL］混合谱系激酶结构域样蛋白；［RIPK］受体相互作用蛋白激酶。[a]与空白对照组比较，P<0.05；[b]与骨髓移植组比较，P<0.05；[c]与 aGVHD 模型组比较，P<0.05。

2.5 FMT 对 RIPK1/RIPK3 通路蛋白表达的影响

Western blot 结果显示，aGVHD 模型组 RIPK1、RIPK3、MLKL、p-MLKL、p-RIPK1 蛋白表达水平较空白对照组升高（P<0.05）；FMT 治疗组 RIPK1、RIPK3、MLKL、p-MLKL、p-RIPK1 蛋白表达水平较 aGVHD 模型组降低（P<0.05）。见图 5、表 2。

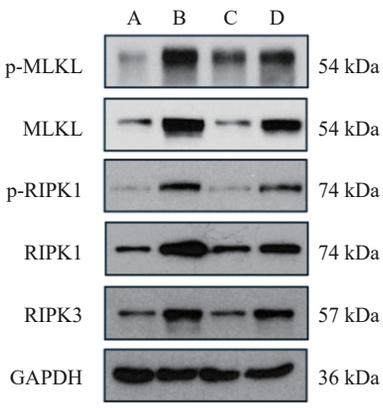


图5　Western blot检测RIPK1/RIPK3通路蛋白及其磷酸化蛋白表达条带图　A：空白对照组；B：aGVHD模型组；C：骨髓移植组；D：FMT治疗组。

2.6　FMT对血浆Reg3α水平的影响

血浆Reg3α检测结果显示，与空白对照组［（39 ± 16）pg/mL］相比，aGVHD模型组［（127 ± 22）pg/mL］、骨髓移植组［（93 ± 19）pg/mL］、FMT治疗组［（84 ± 24）pg/mL］Reg3α浓度升高（P<0.05）；与aGVHD模型组相比，骨髓移植组、FMT治疗组Reg3α浓度降低（P<0.05）；FMT治疗组Reg3α浓度与骨髓移植组比较差异无统计学意义（P>0.05）。

表2　各组RIPK1/RIPK3通路蛋白及其磷酸化蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	p-MLKL	MLKL	p-RIPK1	RIPK1	RIPK3
空白对照组	0.313 ± 0.027	0.40 ± 0.04	0.268 ± 0.029	0.44 ± 0.05	0.376 ± 0.035
骨髓移植组	0.438 ± 0.046[a]	0.37 ± 0.04[a]	0.297 ± 0.036[a]	0.41 ± 0.03[a]	0.358 ± 0.028[a]
aGVHD模型组	1.016 ± 0.068[b]	1.04 ± 0.09[b]	0.976 ± 0.075[b]	1.06 ± 0.09[b]	0.995 ± 0.076[b]
FMT治疗组	0.667 ± 0.057[a,b,c]	0.97 ± 0.07[b,c]	0.608 ± 0.067[a,b,c]	0.85 ± 0.08[a,b,c]	0.867 ± 0.066[a,b,c]
F值	92.15	105.28	118.41	81.25	98.73
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：［RIPK］受体相互作用蛋白激酶；［MLKL］混合谱系激酶结构域样蛋白；［p-RIPK1］磷酸化受体相互作用蛋白激酶1；［p-MLKL］磷酸化混合谱系激酶结构域样蛋白。a示与空白对照组比较，P<0.05；b示与骨髓移植组比较，P<0.05；c示与aGVHD模型组比较，P<0.05。

3　讨论

肠道菌群失调是aGVHD发生发展的重要病理生理基础。研究发现，allo-HSCT患者在移植前后肠道菌群多样性显著降低，布劳特氏菌属、粪杆菌属等有益菌丰度减少与aGVHD发生风险增加密切相关[10]。进一步研究证实，移植后早期维持肠道菌群多样性与更好的临床结局相关，这种关联在儿科患者中更为显著[11]。本研究结果显示，aGVHD模型组小鼠肠道菌群多样性指数显著下降，厚壁菌门相对丰度减少，变形菌门相对丰度增加；FMT治疗可显著改善该菌群失调状态，使菌群多样性得到部分恢复，这与FMT在其他炎症性疾病中的作用机制相似[12]。

研究表明，RIPK1/RIPK3通路在肠道炎症中发挥关键作用。当肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-1β等炎症因子刺激肠上皮细胞时，RIPK1发生磷酸化激活，进而招募并激活RIPK3，二者形成坏死小体复合物[13]；激活的RIPK3进一步磷酸化下游效应分子MLKL，磷酸化的MLKL发生寡聚化后转位至细胞膜，形成膜孔导致细胞破裂死亡[14]。与凋亡不同，程序性坏死伴随大量促炎因子释放，进一步加重组织炎症反应。Kaczmarek等[15]在aGVHD患者肠道活检组织中发现，RIPK3表达显著上调且与疾病严重程度呈正相关，提示该通路在aGVHD发病中起重要作用。本研究结果显示，aGVHD模型组小鼠小肠组织中RIPK1、RIPK3及MLKL蛋白表达均显著上调，且磷酸化水平明显升高，证实程序性坏死通路在小鼠aGVHD模型中被激活。

已有研究表明，肠道菌群可通过多种代谢产物调控宿主免疫反应，其中短链脂肪酸（short-chain fatty acid, SCFA）在调控炎症信号通路中发挥关键作用。Wang等[16]研究指出，丁酸、丙酸等SCFA可抑制NF-κB通路活化，减少肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-1β等促炎因子的产生，进而间接抑制RIPK1/RIPK3介导的程序性坏死通路。Smith等[17]发现，SCFA可通过激活肠上皮细胞表面GPR43、GPR109A等受体，促进抗炎因子白细胞介素-10分泌，从而维持肠道黏膜免疫稳态。此外，Chen等[18]在溃疡性结肠炎模型中发现，FMT可上调肠

道产丁酸菌丰度，提高粪便SCFA含量，并显著下调RIPK3蛋白表达。本研究结果显示，FMT干预后RIPK1、RIPK3、MLKL的蛋白表达及磷酸化水平明显降低。综上提示，FMT可能通过调控SCFA等菌群代谢产物，抑制程序性坏死通路激活，该发现为阐释其在aGVHD胃肠道炎症中的保护作用机制提供了重要依据。

本研究中，FMT治疗重塑了aGVHD小鼠的肠道菌群结构，表现为乳杆菌属、利吉乳杆菌属及阿利斯特菌属A等有益共生菌相对丰度升高，而条件致病相关的未培养菌属CAG-485相对丰度降低。该菌群结构的改善可能通过菌群间生态互作与宿主免疫调控协同介导。已有研究表明，乳酸菌可通过产生细菌素等抑菌代谢物、酸化肠腔环境，有效抑制埃希氏菌–志贺氏菌属等革兰阴性病原菌的黏附与增殖，从而恢复肠道菌群稳态[19]。嗜黏蛋白阿克曼氏菌作为重要的黏液降解菌，可分泌丙酸等SCFA，增强肠道屏障功能并保护肠道免受放射损伤[20]。布劳特氏菌属在低纤维饮食条件下仍可通过分泌丙酸和乙酸维持结肠黏液功能，是肠道黏膜屏障的关键维护者[21]。此外，异杆菌属作为产丁酸菌，其丰度增加与肠道免疫保护密切相关；有研究显示，人普雷沃氏菌可通过扩增异杆菌属丰度、增强丁酸产生发挥抗关节炎作用[22]，提示其在维持肠道微生态平衡中的重要功能。

Reg3α是肠道屏障功能的重要标志物，其表达水平变化可敏感反映肠道炎症程度和微生态平衡状态。Ferrara等[23]在队列研究中发现，aGVHD患者血清Reg3α水平显著升高，且在症状出现前即可检出，提示其可作为aGVHD早期诊断和预后评估指标。Harris等[24]进一步证实，Reg3α水平与aGVHD严重程度、患者生存率密切相关，高Reg3α水平患者的1年生存率显著低于低水平患者。本研究结果显示，aGVHD模型组小鼠血浆Reg3α水平较空白对照组升高，而FMT治疗可显著降低其水平。这与既往研究结果一致：FMT可恢复肠道菌群平衡，减少条件致病菌定植，从而降低对潘氏细胞的刺激[25]；FMT通过抑制RIPK1/RIPK3通路活化，减少肠上皮细胞死亡、维护肠道屏障完整性，从而减少Reg3α的代偿性分泌[26]。

综上所述，FMT可显著改善小鼠allo-HSCT后aGVHD的临床症状和组织病理学损伤，其机制与抑制RIPK1/RIPK3介导的程序性坏死通路激活密切相关。FMT通过恢复肠道菌群多样性，减少促炎因子产生，下调RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白表达，维护肠道屏障功能，从而发挥保护作用。该发现为儿科aGVHD患者的临床治疗提供了新的理论依据和治疗策略，但其临床应用的安全性和有效性仍需大规模临床试验进一步验证。

作者贡献声明：李玥负责研究设计、文献查阅及论文初稿撰写；牛昊书、陆雪莉、李雪春负责实验实施及数据收集；肖敏、王英、杨少静和郭玉宇负责数据整理与统计分析；孙妍负责研究构思、论文审校与修改。

利益冲突声明：所有作者声明不存在利益冲突。

［参 考 文 献］

[1] Zeiser R, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease: biologic process, prevention, and therapy[J]. N Engl J Med, 2017, 377 (22): 2167-2179. PMID: 29171820. PMCID: PMC6034180. DOI: 10.1056/NEJMra1609337.

[2] Cuvelier GDE, Nemecek ER, Wahlstrom JT, et al. Benefits and challenges with diagnosing chronic and late acute GVHD in children using the NIH consensus criteria[J]. Blood, 2019, 134 (3): 304-316. PMID: 31043425. PMCID: PMC6911839. DOI: 10.1182/blood.2019000216.

[3] Saber W, Opie S, Rizzo JD, et al. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia[J]. Blood, 2012, 119(17): 3908-3916. PMID: 22327226. PMCID: PMC3350357. DOI: 10.1182/blood-2011-09-381699.

[4] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*[J]. N Engl J Med, 2013, 368(5): 407-415. PMID: 23323867. DOI: 10.1056/NEJMoa1205037.

[5] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(7): 905-914. PMID: 22718773. PMCID: PMC3657523. DOI: 10.1093/cid/cis580.

[6] Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 46(5): 479-493. PMID: 28707337. DOI: 10.1111/apt.14201.

[7] Prado-Acosta M, Jeong S, Utrero-Rico A, et al. Inhibition of RIP1 improves immune reconstitution and reduces GVHD mortality while preserving graft-versus-leukemia effects[J]. Sci Transl Med, 2023, 15(727): eadf8366. PMID: 38117900. PMCID: PMC11157567. DOI: 10.1126/scitranslmed.adf8366.

[8] van Lier YF, Vos J, Blom B, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation, the microbiome, and graft-versus-host disease [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2178805. PMID: 36794370. PMCID: PMC9980553. DOI: 10.1080/19490976.2023.2178805.

[9] Lim JY, Lee YK, Lee SE, et al. MyD88 in donor bone marrow cells is critical for protection from acute intestinal graft-vs.-host disease[J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(3): 730-743. PMID: 26442657. DOI: 10.1038/mi.2015.96.

[10] Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, et al. Intestinal blautia is associated with reduced death from graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(8): 1373-1383. PMID: 25977230. PMCID: PMC4516127. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016.

[11] Peled JU, Devlin SM, Staffas A, et al. Intestinal microbiota and relapse after hematopoietic-cell transplantation[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(15): 1650-1659. PMID: 28296584. PMCID: PMC5455763. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.3348.

[12] Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1218-1228. PMID: 28214091. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30182-4.

[13] Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis[J]. Science, 2014, 343(6177): 1357-1360. PMID: 24557836. DOI: 10.1126/science.1249361.

[14] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. Mol Cell, 2014, 54(1): 133-146. PMID: 24703947. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.003.

[15] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance[J]. Immunity, 2013, 38(2): 209-223. PMID: 23438821. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.

[16] Wang B, Yao M, Lv L, et al. The human microbiota in health and disease[J]. Engineering, 2017, 3(1): 71-82. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.01.008.

[17] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis[J]. Science, 2013, 341(6145): 569-573. PMID: 23828891. PMCID: PMC3807819. DOI: 10.1126/science.1241165.

[18] Chen Y, Guo J, Qian G, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(9): 1429-1437. PMID: 25711972. DOI: 10.1111/jgh.12932.

[19] Anjana, Tiwari SK. Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 851140. PMID: 35651753. PMCID: PMC9149203. DOI: 10.3389/fcimb.2022.851140.

[20] He KY, Lei XY, Wu DH, et al. *Akkermansia muciniphila* protects the intestine from irradiation-induced injury by secretion of propionic acid[J]. Gut Microbes, 2023, 15(2): 2293312. PMID: 38087436. PMCID: PMC10730217. DOI: 10.1080/19490976.2023.2293312.

[21] Holmberg SM, Feeney RH, Prasoodanan P K V, et al. The gut commensal *Blautia* maintains colonic mucus function under low-fiber consumption through secretion of short-chain fatty acids[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3502. PMID: 38664378. PMCID: PMC11045866. DOI: 10.1038/s41467-024-47594-w.

[22] Balakrishnan B, Luckey D, Bodhke R, et al. *Prevotella* histicola protects from arthritis by expansion of allobaculum and augmenting butyrate production in humanized mice[J]. Front Immunol, 2021, 12: 609644. PMID: 34017324. PMCID: PMC8130672. DOI: 10.3389/fimmu.2021.609644.

[23] Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease[J]. Blood, 2011, 118(25): 6702-6708. PMID: 21979939. PMCID: PMC3242723. DOI: 10.1182/blood-2011-08-375006.

[24] Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD[J]. Br J Haematol, 2013, 160(3): 288-302. PMID: 23205489. PMCID: PMC3552019. DOI: 10.1111/bjh.12142.

[25] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin[J]. Science, 2006, 313(5790): 1126-1130. PMID: 16931762. PMCID: PMC2716667. DOI: 10.1126/science.1127119.

[26] Loonen LM, Stolte EH, Jaklofsky MT, et al. REG3γ-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum[J]. Mucosal Immunol, 2014, 7(4): 939-947. PMID: 24345802. DOI: 10.1038/mi.2013.109.

（本文编辑：杨丹）

（©《中国当代儿科杂志》编辑部，开放获取CC BY-NC-ND 4.0协议）
（© Editorial Office of *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*. OA under CC BY-NC-ND 4.0 license）