分类号：R563.3　　单位代码：10159
密　级：公　开　　学号：2022120615



中国医科大学

硕 士 学 位 论 文

（学术学位）

中文题目：TREM2 在香烟烟雾诱导小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症反应中的作用和机制研究

英文题目：The role and mechanisms of TREM2 in cigarette smoke-induced necroptosis and inflammatory response in mouse pulmonary macrophages

论文作者：丁玉霄

指导教师：尹 燕 教授

学科专业：内科学

完成时间：2025年3月

中国知网　https://www.cnki.net

中国医科大学硕士学位论文

TREM2 在香烟烟雾诱导小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症反应中的作用和机制研究

The role and mechanisms of TREM2 in cigarette smoke-induced necroptosis and inflammatory response in mouse pulmonary macrophages

论文作者 丁玉霄　　指导教师 尹燕 教授

申请学位 医学硕士　　培养单位 第一临床学院

一级学科 临床医学　　二级学科 内科学

研究方向 烟草烟雾相关疾病

论文起止时间 2022年11月—2025年2月

论文完成时间 2025年3月

中国医科大学（辽宁）

2025 年 3 月

中国知网 https://www.cnki.net

摘 要

研究背景：香烟烟雾是慢性阻塞性肺疾病（简称慢阻肺）等呼吸系统疾病的重要环境危险因素，其致病机制与肺部的免疫细胞密切相关。肺巨噬细胞作为主要效应细胞，其在香烟烟雾诱导的炎症和细胞死亡中起着关键作用。研究表明，坏死性凋亡作为一种特殊的程序性细胞死亡形式，不仅能够介导细胞膜破裂释放损伤相关分子模式，还可放大炎症级联反应，从而加重肺部炎症反应。现有研究表明，香烟烟雾暴露能够激活肺巨噬细胞的坏死性凋亡通路，从而加重肺部炎症反应。提示坏死性凋亡可能在香烟烟雾暴露相关肺疾病中具有重要意义。因此，抑制香烟烟雾所致的肺巨噬细胞坏死性凋亡是治疗慢阻肺病等吸烟所致的肺部疾病的重要靶点。髓系细胞触发受体 2（Triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2）是一种髓系细胞免疫受体，其在调节免疫细胞功能及炎症反应中的作用备受关注。近年来，TREM2 被发现与细胞凋亡、焦亡等多种死亡方式密切相关，但是 TREM2 是否参与调节香烟烟雾诱导的小鼠肺巨噬细胞的坏死性凋亡及炎症反应尚不明确。

目的:因此本研究的目的是探讨 TREM2 是否参与调控香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞的坏死性凋亡和炎症反应及其作用的具体机制。

研究方法：将 60 只 6-8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组和熏烟组。对熏烟组进行每天早晚各一次，每次 20 支香烟，连续 6 个月的全身香烟烟雾（万宝路）暴露。6 个月后处死小鼠，取材。首先是体内实验，通过 HE 染色评估对照组和熏烟组两组小鼠肺部病理学改变；然后用免疫荧光染色双染和免疫组化评估两组小鼠肺巨噬细胞细胞中 phospho-MLKL（ p-MLKL）的表达情况；qRT-PCR 检测两组肺泡灌洗液（Bronchoalveolar lavage fluid, BALF）中肺巨噬细胞炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 表达水平。在体外实验中，我们选用了小鼠肺巨噬细胞系 MH-S 细胞。首先，我们探索了香烟提取物（cigarette smoke extract, CSE）在不同浓度下对 MH-S 细胞细胞活力的影响；用 Western blot（WB）和细胞免疫荧光染色检测不同浓度 CSE 作用下的 MH-S 细胞 p-MLKL 蛋白表达情况；qRT-PCR 对 MH-S 细胞中的炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平进行检测。其次，用坏死性凋亡核心蛋白 MLKL 抑制剂 GW806742X 对 CSE 刺激的 MH-S 细胞进行抑制，用 CCK-8 检测细胞活力值、qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平。其次，利用生信分析确定吸烟者和非吸烟者肺巨噬细胞中 TREM2 的差异表达，在体内实验中，进一步用

中国知网 https://www.cnki.net

流式细胞术和 qRT-PCR 明确小鼠肺巨噬细胞中 TREM2 的蛋白和 mRNA 表达水平；体外实验则是用 WB 检测不同浓度 CSE 处理的 MH-S 细胞中 TREM2 的表达水平；qRT-PCR 检测 MH-S 细胞中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平。为证明 TREM2 与坏死性凋亡相关联，我们基于 coexpedia 数据库，对 TREM2 和坏死性凋亡进行了功能富集分析，然后用小干扰 RNA（siRNA）对 TREM2 进行敲减处理，然后对 TREM2 敲减后的 CSE 刺激的 MH-S 细胞进行细胞活力检测；WB 检测 TREM2 敲减后 MH-S 细胞中 p-RIPK3、p-MLKL 的蛋白水平；qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 mRNA 水平。为了研究 TREM2 调控香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡的具体机制，我们用生信分析明确了吸烟者和非吸烟者肺巨噬细胞中 HIF-1α 的差异表达；在体外实验中，我们用 WB 检测了 CSE 刺激的 MH-S 细胞中 HIF-1α 的表达水平。然后为了证明 TREM2 对 HIF-1α 的调控作用，我们又用 WB 检测了敲减 TREM2 后 MH-S 细胞中 HIF-1α 的蛋白表达水平。为了进一步证明 TREM2 通过调控 HIF-1α 从而激活 RIPK3/MLKL 信号通路，我们在 TREM2 敲减的基础上对 HIF-1α 进行抑制处理，WB 检测 p-RIPK3、p-MLKL 的蛋白水平；qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 mRNA 水平。

结果：TREM2 通过抑制 HIF-1α 的表达进而激活香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应。1、香烟烟雾暴露促进了小鼠肺气肿的形成。2、香烟烟雾暴露可增加小鼠肺巨噬细胞中 p-MLKL 的蛋白水平、炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平。3、CSE 在不同浓度下对 MH-S 细胞细胞活力有影响。4、CSE 可促进 MH-S 细胞中 p-MLKL 及其上游调控分子 p-RIPK3 蛋白表达升高、炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平升高。5、MLKL 抑制剂 GW806742X 能够抑制 CSE 刺激的 MH-S 细胞的死亡和炎症反应。6、生信分析明确了吸烟者与非吸烟者相比肺巨噬细胞中 TREM2 的表达升高。7、香烟烟雾暴露可增加小鼠肺巨噬细胞中 TREM2 的蛋白水平和 mRNA 水平。8、CSE 可增加 MH-S 细胞中 TREM2 的蛋白表达水平。9、生信分析明确 TREM2 和坏死性凋亡之间的潜在互作靶点。10、敲减 TREM2 后能够减轻 CSE 诱导的 MH-S 细胞的死亡。11、敲减 TREM2 后 p-MLKL、p-RIPK3 的蛋白表达下降、炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 的 mRNA 水平降低。12、生信分析明确了吸烟者肺巨噬细胞中 HIF-1α 较非吸烟者显著下调。13、CSE 刺激能够抑制 MH-S 细胞中 HIF-1α 的蛋白表达。并且敲减 TREM2 后能逆转 CSE 对 HIF-1α 蛋白水平的抑制。14、对 HIF-1α 进行抑制处理后，TREM2 敲减的 MH-S 细胞中 p-RIPK3 和 p-MLKL 的蛋白水平升高、炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10mRNA 水平升高。

中国知网 https://www.cnki.net

结论：香烟烟雾通过激活 TREM2 受体下调 HIF-1α，进而触发 RIPK3/MLKL 信号通路介导的肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症反应。

关键词：TREM2；香烟烟雾；肺巨噬细胞；坏死性凋亡；肺部炎症

中国知网 https://www.cnki.net

Abstract

Background and Objective: Smoking is a significant environmental risk factor for respiratory diseases such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), and its pathogenic mechanism is closely related to pulmonary immune cells. As a major effector cell, pulmonary macrophages play a crucial role in cigarette smoke-induced inflammation and cell death. Studies have shown that necroptosis, as a specific form of programmed cell death, not only mediates cell membrane rupture to release damage-associated molecular patterns (DAMPs) but also amplifies the inflammatory cascade, thereby exacerbating pulmonary inflammatory responses. Existing research indicates that cigarette smoke exposure can activate the necroptosis pathway in pulmonary macrophages, aggravating lung inflammation. This suggests that necroptosis may play a significant role in cigarette smoke-associated pulmonary diseases. Therefore, inhibiting cigarette smoke-induced necroptosis in pulmonary macrophages represents a crucial therapeutic target for smoking-related lung diseases such as COPD.

Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2), an immune receptor of myeloid cells, has attracted considerable attention for its role in regulating immune cell function and inflammatory responses. Recent studies have revealed TREM2's close association with various cell death pathways including apoptosis and pyroptosis. However, it remains unclear whether TREM2 participates in regulating cigarette smoke-induced necroptosis in murine pulmonary macrophages. This study aims to investigate TREM2's involvement in cigarette smoke-induced macrophage necroptosis and its specific mechanisms.

Methods: Sixty male C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were randomly divided into a control group and a smoking group. The smoking group was exposed to whole-body cigarette smoke (Marlboro) twice a day, morning and evening, 20 cigarettes each time, for 6 months. After 6 months, the mice were sacrificed and samples were collected. In the in vivo experiment, the pathological changes in the lungs of the two groups of mice were assessed by H&E staining; the expression of phospho-MLKL (p-MLKL) in pulmonary macrophages of the two groups was evaluated by double immunofluorescence staining and immunohistochemistry; the mRNA expression levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10 in pulmonary

中国知网 https://www.cnki.net

macrophages in the bronchoalveolar lavage fluid(BALF) of the two groups were detected by qRT-PCR. In the in vitro experiment, the mouse pulmonary macrophage cell line MH-S was used. First, the effects of cigarette smoke extract (CSE) at different concentrations on the viability of MH-S cells were explored; the protein expression of p-MLKL in MH-S cells treated with different concentrations of CSE was detected by WB and immunofluorescence staining; the mRNA levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10 in MH-S cells were detected by qRT-PCR. Subsequently, the necroptosis core protein MLKL inhibitor GW806742X was used to inhibit CSE-stimulated MH-S cells, and cell viability was detected by CCK-8, while the mRNA levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10 were detected by qRT-PCR. Next, bioinformatics analysis was used to determine the differential expression of TREM2 in pulmonary macrophages of smokers and non-smokers. In the in vivo experiment, flow cytometry and qRT-PCR were further used to clarify the protein and mRNA expression levels of TREM2 in mouse pulmonary macrophages; in the in vitro experiment, the expression of TREM2 in MH-S cells treated with different concentrations of CSE was detected by WB, and the mRNA levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10 in MH-S cells were detected by qRT-PCR. To demonstrate the association between TREM2 and necroptosis, functional enrichment analysis of TREM2 and necroptosis was performed based on the coexpedia database. Then, small interfering RNA (siRNA) was used to knock down TREM2, and cell viability of CSE-stimulated MH-S cells with TREM2 knockdown was detected. WB was used to detect the protein levels of p-RIPK3 and p-MLKL in MH-S cells with TREM2 knockdown, and qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10. To investigate the specific mechanism by which TREM2 regulates cigarette smoke-induced necroptosis of pulmonary macrophages, bioinformatics analysis was used to clarify the differential expression of HIF-1α in pulmonary macrophages of smokers and non-smokers. In the in vitro experiment, the expression level of HIF-1α in CSE-stimulated MH-S cells was detected by WB. Then, to demonstrate the regulatory effect of TREM2 on HIF-1α, WB was used to detect the protein expression level of HIF-1α in MH-S cells with TREM2 knockdown. To further demonstrate that TREM2 activates the RIPK3/MLKL signaling pathway by regulating HIF-1α, HIF-1α was inhibited on the basis of TREM2 knockdown, and the protein levels of p-RIPK3 and p-MLKL were detected by WB, while

中国知网 https://www.cnki.net

the mRNA levels of the inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-10 were detected by qRT-PCR.

Results:TREM2 activates cigarette smoke-induced necroptosis and inflammatory response in pulmonary macrophages by inhibiting the expression of HIF-1α. 1. Cigarette smoke exposure promotes the formation of emphysema in mice. 2. Cigarette smoke exposure increases the protein level of p-MLKL and the mRNA levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-10 in mouse lung macrophages. 3. CSE (cigarette smoke extract) at different concentrations affects the cell viability of MH-S cells. 4. CSE promotes the increased expression of p-MLKL and its upstream regulatory molecule p-RIPK3, as well as the elevated mRNA levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-10 in MH-S cells. 5. The MLKL inhibitor GW806742X can inhibit CSE-induced cell death and inflammation in MH-S cells. 6. Bioinformatics analysis revealed an increased expression of TREM2 in lung macrophages of smokers compared to non-smokers. 7. Cigarette smoke exposure increases both the protein and mRNA levels of TREM2 in mouse lung macrophages. 8. CSE increases the protein expression of TREM2 in MH-S cells. 9. Bioinformatics analysis identified potential interaction targets between TREM2 and necroptosis. 10. Knockdown of TREM2 alleviates CSE-induced cell death in MH-S cells. 11. After TREM2 knockdown, the protein expression of p-MLKL and p-RIPK3 decreases, and the mRNA levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-10 are reduced. 12. Bioinformatics analysis confirmed that HIF-1α is significantly downregulated in the lung macrophages of smokers compared to non-smokers. 13. CSE stimulation suppresses HIF-1α protein expression in MH-S cells, and TREM2 knockdown can reverse this suppression of HIF-1α protein levels. 14. After inhibiting HIF-1α, the protein levels of p-RIPK3 and p-MLKL, as well as the mRNA levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-10, increase in TREM2 knockdown MH-S cells.

Conclusion: Cigarette smoke exposure induces upregulation of TREM2 in pulmonary macrophages, which activates the RIPK3/MLKL signaling pathway by inhibiting HIF-1α, leading to necroptosis of pulmonary macrophages and increased inflammatory factors, thereby exacerbating pulmonary inflammatory responses.

Keywords: TREM2; cigarette smoke; pulmonary macrophages; necroptosis; pulmonary inflammation

中国知网 https://www.cnki.net

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	支气管肺泡灌洗液
BSA	Bovine Serum albumin	牛血清白蛋白
CSE	Cigarette smoke extract	香烟提取物
DAMPs	damage associated molecular patterns	损伤相关分子模式
HIF-1α	Hypoxia inducible factor 1α	缺氧诱导因子-1α
IL	Interleukin	白介素
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like pseudokinase	混合谱系激酶结构域样假激酶
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	实时荧光定量逆转录聚合酶链反应
RIPK3	Receptor-interacting protein kinase 3	受体相互作用的丝氨酸-苏氨酸激酶 3
TNF-α	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子-α
TBST	Tris-HCl buffered solution,Tween-20	磷酸盐缓冲液，吐温20
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	髓细胞触发受体-2
WB	WB	蛋白免疫印迹

中国知网 https://www.cnki.net

目 录

1 前言.....1
2 材料与方法.....4
2.1 主要试剂和仪器.....4
2.1.1 主要试剂.....4
2.1.2 主要仪器.....5
2.2 研究对象和方法.....6
2.2.1 实验动物准备.....6
2.2.2 建立香烟烟雾暴露小鼠肺气肿模型.....6
2.2.3 小鼠肺组织 HE 染色.....6
2.2.4 小鼠肺组织冰冻切片制备.....7
2.2.5 小鼠肺组织免疫荧光染色.....7
2.2.6 小鼠肺组织免疫组化.....7
2.2.7 小鼠肺巨噬细胞分离及 qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10.....8
2.2.8 MH-S 细胞细胞培养.....9
2.2.9 CSE 的制备.....9
2.2.10 CCK-8 细胞活力检测.....10
2.2.11 WB 检测 MH-S 细胞内蛋白表达情况.....10
2.2.12 qRT-PCR 测定 MH-S 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-10m RNA 水平.....11
2.2.13 生物信息学数据分析.....11
2.2.14 小鼠 BALF 中肺巨噬细胞收集及流式检测.....11
2.2.15 使用 MLKL 抑制剂对 MH-S 细胞进行处理.....12
2.2.16 对 MH-S 细胞进行小干扰 RNA(si RNA)转染.....12
2.2.17 TREM2 敲减后 HIF-1α 抑制剂处理.....12
2.2.18 统计学分析.....12
3 结果.....13
3.1 香烟烟雾诱导小鼠肺气肿造模成功.....13
3.2 香烟烟雾诱导肺巨噬细胞的炎症反应和坏死性凋亡.....13
3.2.1 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞炎症因子表达.....14
3.2.2 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡核心蛋白的表达.....14
3.2.3 不同浓度 CSE 对 MH-S 细胞活性的影响.....16
3.2.4 CSE 促进了 MH-S 细胞中炎症因子的表达.....16

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.5 CSE 促进 MH-S 细胞坏死性凋亡相关蛋白表达.....17
3.2.6 抑制 MLKL 能够减轻 CSE 引起的 MH-S 细胞的死亡和炎症反应.....18
3.3 TREM2 在香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应中具有重要作用.....19
3.3.1 香烟烟雾诱导的慢阻肺模型中肺巨噬细胞的差异基因表达情况.....19
3.3.2 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞 TREM2 的表达.....20
3.3.3 CSE 促进 MH-S 细胞中 TREM2 的表达.....21
3.3.4 生信分析寻找 TREM2 和坏死性凋亡的潜在互作靶点.....21
3.3.5 敲减 TREM2 后能够抑制 CSE 引起的 MH-S 细胞死亡22
3.3.6 敲减 TREM2 后能够逆转 CSE 诱导的 MH-S 细胞中炎症因子的表达升高.....23
3.3.7 敲减 TREM2 后能够逆转 CSE 诱导的 MH-S 细胞坏死性凋亡相关蛋白表达升高.....24
3.4 TREM2 通过调控 HIF-1α 进而促进了香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应.....25
3.4.1 香烟烟雾诱导的慢阻肺模型中肺巨噬细胞差异基因表达情况.....25
3.4.2 敲减 TREM2 能够上调 CSE 诱导的 MH-S 细胞中 HIF-1α 的表达.....26
3.4.3 TREM2 通过下调 HIF-1α 的表达激活 CSE 诱导的 MH-S 细胞坏死性凋亡进而促进炎症反应.....27
4 讨论.....30
5 结论.....34
本研究创新性的自我评价.....35
参考文献.....36
综述 巨噬细胞程序性死亡在吸烟相关肺部疾病中的作用机制.....42
参考文献.....52

中国知网 https://www.cnki.net

TREM2 在香烟烟雾诱导小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症反应中的作用和机制研究

1 前言

吸烟是全球范围内导致慢阻肺、肺癌和心血管疾病等重大健康问题的主要环境因素[1][2]。据世界卫生组织统计，每年因吸烟导致的死亡人数超过 800 万[3]。香烟烟雾中含有多种有害的化学物质，其中尼古丁、焦油、一氧化碳等多种致癌物质能够对肺部组织和细胞如肺上皮细胞、气道平滑肌和免疫细胞等造成严重损伤[4] [5]。长期吸烟导致的肺部慢性炎症反应不仅会破坏肺组织的结构，还会加剧气道重塑导致肺功能下降[5]。其机制涉及氧化应激、炎症反应以及基因表达调控等多个层面[6] [7]。吸烟引起的肺部疾病的发病核心机制涉及多种免疫细胞，尤其是肺巨噬细胞的异常激活和炎症反应的失控[8]，其对呼吸系统的危害尤为显著。进一步研究香烟烟雾与肺部疾病之间的关系，对于预防和治疗香烟烟雾相关肺部疾病具有重要意义。

肺巨噬细胞作为肺部免疫防御的关键细胞，不仅能够清除外来病原体还能通过分泌 TNF-α、IL-1β 炎症因子等调控肺部炎症反应[9]。近年来的研究发现，香烟烟雾暴露会导致肺巨噬细胞的功能紊乱。导致巨噬细胞的功能异常，表现为吞噬能力下降、炎症因子过度分泌，进而引发慢性肺部炎症和组织损伤，使其成为肺部慢性炎症的推动者，进而加剧肺部疾病的发生和发展[10] [11]。暴露于香烟烟雾后，肺巨噬细胞能够激活 NF-κB 和丝裂原活化蛋白激酶，从而促进促炎细胞因子和趋化因子的产生，使其成为肺部慢性炎症的推动者，进而加剧肺部疾病的发生和发展[12] [13]。香烟烟雾能够通过激活巨噬细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞等免疫细胞触发肺部炎症反应，从而释放促炎细胞因子和蛋白酶[14]。香烟烟雾引起的持续性炎症会导致组织重塑、肺壁破坏和肺功能丧失[15]，这些都是慢阻肺的标志性特征。巨噬细胞作为呼吸道的第一道免疫防线，其死亡模式的选择直接决定肺部炎症反应的走向。细胞死亡既是维持组织稳态的重要防线，也是疾病发生发展的关键枢纽[16]。肺巨噬细胞不仅负责吞噬病原体和颗粒物，还通过调控炎症反应维持肺微环境的稳态[17]，然而，长期暴露于香烟烟雾环境中可导致肺巨噬细胞的死亡[18]，进而引发炎症失控、蛋白

中国知网 https://www.cnki.net

酶-抗蛋白酶失衡及组织修复障碍[19]。尽管近年研究发现香烟烟雾通过氧化应激、线粒体损伤及内质网应激等途径诱导肺巨噬细胞凋亡、铁死亡、坏死性凋亡或焦亡等一系列死亡方式[20] [21]，但其核心调控机制仍未完全阐明。这限制了对吸烟相关肺病分子靶点的精准干预。

坏死性凋亡作为一种受调控的促炎性死亡方式，因其独特的分子机制（依赖RIPK1-RIPK3-MLKL信号轴）及其与慢性炎症的强关联性，逐渐成为研究热点[22]。坏死性凋亡的激活需经历 RIPK1 与 RIPK3 的磷酸化及复合体形成，进而磷酸化 MLKL 并触发其寡聚化及膜穿孔，最终导致细胞膜破裂并释放损伤相关分子模式（DAMPs）[23]，加剧局部炎症反应。在吸烟者肺部，坏死性凋亡可能通过双重机制驱动疾病进展：一方面，肺巨噬细胞的坏死性凋亡直接破坏其免疫监视功能，导致病原体清除障碍[24]；另一方面，死亡细胞释放的 DAMPs 通过激活肺上皮细胞及邻近免疫细胞中的模式识别受体（如 TLR4），形成“死亡-炎症”恶性循环[25]。然而，香烟烟雾是否通过特异性激活坏死性凋亡途径诱导肺巨噬细胞死亡，其分子开关如何调控，仍是亟待解决的科学问题。值得注意的是，坏死性凋亡的调控具有显著的环境依赖性：在病毒性肺炎中，RIPK3 缺失可减轻肺损伤[25]；但在细菌性感染中，坏死性凋亡反而通过限制病原体扩散发挥保护作用[26]。这提示，香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡可能具有“双刃剑”特性——适度激活可能通过清除功能失调的肺巨噬细胞维持稳态，但过度激活则导致免疫屏障崩溃。因此，阐明香烟烟雾调控肺巨噬细胞坏死性凋亡的分子机制，尤其是关键调控节点的鉴定，对精准干预吸烟相关肺病至关重要。

TREM2 是一种主要表达在单核巨噬细胞等髓系细胞表面的跨膜免疫受体，属于免疫受体超家族中的一员[27]。其对细胞的主要作用方式是通过与 DAP12 结合，激活下游信号通路，调节炎症反应和免疫应答。近年来，TREM2 在肺部炎症中的研究逐渐增多。例如，TREM2 能够通过调节肺巨噬细胞的鞘脂代谢来影响肺纤维化的发展[28]；TREM2 缺失可能通过调控肺巨噬细胞的焦亡从而加重肺缺血再灌注损伤；目前最新研究表明新冠病毒感染后 $TREM2^{+}$巨噬细胞亚群在感染晚期出现，促进炎症消退和组织损伤修复[29]。此外，TREM2 还参与调节巨噬细胞活化和极化，进而影响炎症反应和组织重塑[30]。这些研究都提示 TREM2 在肺部的作用机制复杂，其在不同肺部疾病中的表达和功能有所变化，为疾病的诊断和治疗提供了新的思路和靶点。未来的研究将进一步揭示 TREM2 在肺部炎症中的具体机制，为开发新的

中国知网 https://www.cnki.net

治疗策略提供理论依据。然而，TREM2 是否参与香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡的调控并且其作用机制及与肺损伤进展的关联尚属未知，仍缺乏系统性研究。

生物信息学（Bioinformatics）作为整合多组学数据与计算模型的前沿学科，为解析疾病相关基因的时空表达特征及功能互作提供了高效工具。传统实验方法在筛选吸烟相关肺损伤标志物时面临通量低、成本高等局限，而基于高通量测序数据的生物信息学分析，可通过差异表达基因（DEGs）筛选、加权基因共表达网络（WGCNA）、功能富集分析等技术，系统性揭示关键调控基因及其信号通路[31]。

缺氧诱导因子-1α（HIF-1α）是细胞适应低氧环境的核心转录因子，但其在常氧条件下亦可被活性氧、炎症因子或香烟烟雾中的毒性成分（如丙烯醛）稳定激活[32]。HIF-1α 通过调控糖酵解、铁代谢及炎症相关基因表达，重塑巨噬细胞的代谢表型与功能[33] [34] [35]。近年来，HIF-1α 被证实与程序性细胞死亡密切相关：在脓毒症模型中，HIF-1α 通过增强糖酵解促进巨噬细胞焦亡[36]；而在肿瘤微环境中，HIF-1α 通过上调 BNIP3 诱导线粒体自噬依赖性细胞死亡[37] [38]。尤为重要的是，HIF-1α 可能通过调控 RIPK3 表达或 MLKL 磷酸化直接参与坏死性凋亡进程。例如，在缺血再灌注损伤中，HIF-1α 的激活可增强 RIPK3 转录，进而放大坏死性凋亡信号[39]。在香烟烟雾暴露条件下，HIF-1α 是否通过代谢重编程或直接调控 RIPK3/MLKL 轴影响肺巨噬细胞坏死性凋亡，尚未明确。

所以，在这里我们假设 TREM2 通过调控 HIF-1α 的表达影响肺巨噬细胞的坏死性凋亡进程。从而影响细胞的“细胞死亡-炎症放大”循环，为吸烟相关肺部疾病的精准治疗开辟新路径。

中国知网 https://www.cnki.net

2 材料与方法

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 主要试剂

BCA 蛋白浓度测定试剂盒	（中国 Beyotime 公司）
蛋白 Marker	（上海 雅酶 公司）
Loading Buffer	（苏州 新赛美 公司）
CCK8 试剂	（中国 biosharp 公司）
粉剂型Trans 缓冲液	（中国塞维尔 公司）
2xTB Green Premix Ex Taq II	（北京 天根 公司）
DEPC 处理水	（中国 Solarbio 公司）
PMSF	（中国 Beyotime 公司）
RIPA 裂解液	（中国 Beyotime 公司）
粉剂型TBS 缓冲液	（中国塞维尔 公司）
β-actin 抗体	（美国 Affinity 公司）
甲醇	（中国 恒兴 公司）
反转录试剂盒	（北京 天根 公司）
粉剂型Running 缓冲液	（中国 塞维尔 公司）
Western 一抗二抗去除液	（中国 Beyotime 公司）
吐温-20	（中国 Solarbio 公司）
SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒	（上海 雅酶 公司）
香烟	（美国Marlboro 公司）
0.22μm 过滤器	（美国 Millipore 公司）
多聚甲醛	（中国Macklin 公司）
戊巴比妥钠	（天津 瑞金特 公司）
粉剂型PBS 缓冲液	（中国 塞维尔 公司）
二甲基亚砜	（中国Solarbio 公司）
二甲苯	（中国杭州化学试剂厂）

中国知网 https://www.cnki.net

无水乙醇	（中国 恒兴 公司）
苏木素-伊红染液	（大连 Meilunbio 公司）
RPMI 1640 培养基	（美国Hyclone 公司）
青链霉素混合液	（中国 Solarbio 公司）
流式细胞术荧光标记抗体	（美国Biolegend 公司）
胎牛血清	（美国 CLARK 公司）
红细胞裂解液	（中国Solarbio 公司）
抗荧光衰减封片剂	（中国Solarbio 公司）
Alexa Fluor 488标记山羊抗兔 IgG（H+L）	（中国 Beyotime 公司）
磷酸化 RIPK3 抗体	（英国Abcam 公司）
RIPK3 抗体	（北京Bioss 公司）
DAPI染色	（中国 Solarbio 公司）
磷酸化MLKL 抗体	（英国Abcam 公司）
MLKL 抗体	（北京Bioss 公司）
Anti-rat IgG (H+L), (Alexa Fluor® 647)	（美国CST 公司）
F4/80 抗体	（美国CST 公司）
TREM2 siRNA	（上海 生工 公司）
BAY 87-2243	（美国MCE 公司）
Lipofectmine 2000 转染试剂	（美国 Invitrogen 公司）
GW806742X	（美国MCE 公司）
Opti-MEM 减血清培养基	（美国 Invitrogen 公司）

2.1.2 主要仪器

Light Cycler 4 80 实时荧光定量PCR仪	（美国 Roche 公司）
电泳仪	（美国 Bio-Rad 公司)
电泳槽	（美国 Bio-Rad 公司）
组织石蜡切片机	（德国 leica 公司）
凝胶成像系统	（美国 Bio-Rad 公司)
超净工作台	（美国 Thermo 公司）
二氧化碳培养箱	（美国 Thermo 公司）
组织脱水仪	（德国 leica 公司）

中国知网 https://www.cnki.net

多功能酶标仪	（瑞士 TECAN 公司）
石蜡包埋机	（德国 leica 公司）
全身口鼻全相态/烟雾毒性试验设施（8050F 型）	（天津 合普工贸 公司）
离心机	（德国 Eppendorf 公司）
显微镜拍照系统	（德国 Nikon 公司）
冰冻切片机	（德国 leica 公司）
流式细胞仪	（美国 BD 公司）

2.2 研究对象和方法

2.2.1 实验动物准备

60 只 6-8 周龄 SPF 级C57BL/6 雄性小鼠购自北京斯贝福生物公司，体重18-22g，随机分成 2 组：对照组和熏烟组，每组 30 只。在室温 22℃左右、湿度 40%的条件下饲养，定期喂水喂食，更换垫料，适应 1 周后开始进行香烟烟雾暴露处理，所有动物的处理和程序均经动物伦理委员会批准（KT2022468）。

2.2.2 建立香烟烟雾暴露小鼠肺气肿模型

适应后的小鼠对照组 30 只暴露于空气中，熏烟组 30 只小鼠通过全身口鼻全相/烟毒实验设备进行香烟烟雾暴露处理，每天两次暴露，两次间隔 6-8h，每次暴露时间为 1.5 小时，每次 20 支香烟，持续 6 个月，6 个月后造模完成并进行取材。

2.2.3 小鼠肺组织 HE 染色

首先对小鼠进行麻醉处理，小鼠麻醉后脱颈处理处死小鼠。将小鼠固定在操作台上，小心将小鼠胸腔剪开，注意不要戳破肺组织。充分暴露心脏，然后用装有 PBS 的注射器插入小鼠左心室同时扯破小鼠右心耳，然后进行小鼠的体循环灌流，充分灌流后将心脏剪下，小心剥离肺组织，并结扎左肺。分离出小鼠气管后用塑料套管插入小鼠气管并固定，用 0.2ml 的 4%多聚甲醛缓慢的打入小鼠右肺，对小鼠右肺进行内固定，结扎，取下肺组织在 4%多聚甲醛中固定 72 小时,然后自来水下流水 4 小时，再用全自动脱水机进行脱水处理，脱水完成后把肺组织放入石蜡包埋机中浸蜡 2 个小时，浸蜡完成后进行石蜡包埋，将肺组织在-20℃下冰冻 20 分钟，然后进行切片，切片放入 65℃烤箱中烘烤 2 小时，取出肺组织分别在二甲苯 I 和二甲苯 II 中浸泡各 15 分钟，无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%酒精、80%酒精、70%酒精、50%酒精

中国知网 https://www.cnki.net

中各浸泡 5 分钟，流水 5 分钟，苏木素染色 2 分钟，在装满水的容器里涮洗 3 下，盐酸酒精分化 2 秒，流水冲洗 10 分钟，伊红染色液染色 20 秒，流水 5 分钟，依次于上述不同浓度酒精中按反方向脱水各 15 秒，在二甲苯中透明分钟，中性树胶封片。

光镜下观察肺组织切片，观察肺组织是否有炎症细胞浸润、支气管壁和肺的完整性，是否有肺气肿形成等现象。并且分别计算两组的平均肺泡间隔(Mean linear intercept，MLI)（具体方法：沿切片的最大横径和纵经任意选取 10 个视野，避开大血管和支气管，在每个视野正中心划“十”字交叉线。计数与交叉线相交的肺泡间隔数记为 Ns，测量十字线总长度记为 L，平均肺泡间隔=L/Ns，其数值反应肺泡平均直径）和平均肺泡面积(Mean alveolar area， MAA)（使用 ImageJ 软件进行平均肺泡面积计算）。

2.2.4 小鼠肺组织冰冻切片制备

小鼠肺组织内固定方法同上，然后将小鼠肺组织在肺门处结扎，剪下放置于 4%多聚甲醛试剂中固定 24h，24h 后将肺组织从多聚甲醛里取出，剪开线结，将肺组织放入 30%蔗糖溶液中，每天换一次新的蔗糖溶液，共换 2 次。将肺组织取出放在塑料包埋盒中，加入 OCT 包埋剂，保证完全覆盖住肺组织，将包埋好的肺组织放进-80℃进行冰冻，使用冰冻切片机将所需的包埋好的组织切成 6μm 的白片，冰冻白片切片或进行后续实验。

2.2.5 小鼠肺组织免疫荧光染色

将冰冻切片用 PBS 清洗 3 次，每次 5min，每张玻片滴加组织细胞固定液，固定肺组织 10min,PBS 清洗清洗 3 次，每次 5min，后滴加 5%现配的 BSA 对肺组织进行封闭 30min，将玻片放入湿盒中滴加一抗，4℃孵育过夜，取出切片，复温至少 30min，回收一抗，将玻片置于玻片架上，于 PBS 中清洗 3 次，每次 5min。将玻片重新放入湿盒内，滴加荧光二抗（根据说明书稀释比例，Alexa Fluor 647: 1:1000；Alexa Fluor 488: 1:500，用 PBS 稀释，现用现配），至完全覆盖肺组织，室温避光孵育 1h。倾去二抗，将玻片重新置于玻片架上，用 PBS 洗涤 5min，重复 3 次，滴加含有 DAPI 的抗荧光衰减封片剂进行封片，室温孵育 15min，于正置荧光显微镜下观察图像并对图片进行保存。

2.2.6 小鼠肺组织免疫组化

中国知网 https://www.cnki.net

小鼠肺组织取材固定蜡块包埋切片脱蜡步骤同上。PBS 洗涤切片 3 次，每次 5 分钟。倒掉 PBS，将切片浸入配好的柠檬酸盐缓冲液中，然后微波法进行抗原修复，高火 10 分钟使其沸腾，后维持中高火修复 20-25 分钟。PBS 洗涤切片 3 次，每次 5 分钟。甩干玻片水分，用免疫组化笔圈出肺组织，内源性过氧化物酶覆盖肺组织，湿盒内室温放置 10 分钟。PBS 洗涤玻片 3 次，每次 5 分钟。甩干玻片水分，非特异性染色阻断封闭液覆盖肺组织切片，湿盒内室温封闭 15 分钟。甩干玻片，按照一抗按说明书推荐比例稀释（p-MLKL 稀释比例为 1：150,用一抗稀释液进行稀释）一抗，稀释后的一抗滴加在肺组织上，4℃湿盒中过夜孵育 12-16 小时。取出湿盒复温至少 30min， PBS 洗涤玻片 3 次，每次 5 分钟。重新放回湿盒中，生物素标记的山羊抗小鼠二抗完全覆盖肺组织切片，室温孵育 10 分钟。PBS 洗涤切片 3 次，每次 5 分钟。链霉素抗生物素蛋白完全覆盖肺组织切片，室温孵育 10 分钟。PBS 洗涤玻片 3 次，每次 5 分钟。DAB 显色 7 分钟（确保每张玻片显色时间相同）。自来水洗涤切片 7 分钟，苏木素染色 20s，流水中冲至无色，盐酸酒精中分化数秒，流水冲洗 7 分钟。75%-85%-95%-无水乙醇 II-无水乙醇 I 脱水，每个步骤 15s，二甲苯 I、II 各透明 3 分钟，使用中性树胶封片。切片干燥后在光学显微镜下观察。使用 ImageJ 软件分析。

2.2.7 小鼠肺巨噬细胞分离及 qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10

收集小鼠肺泡灌洗液：麻醉、处死小鼠方法同上，把小鼠固定在操作台上，充分暴露小鼠气管，并用套管针插入小鼠气管，注意不要穿透，固定套管针，用 1ml 注射器抽取 0.8ml PBS 对小鼠进行灌肺处理，缓慢将 PBS 经套管针灌入肺泡腔，然后小心将肺泡灌洗液抽出，回抽率大概在 70%，重复灌洗三次。收集好的肺泡灌洗液用 4℃，1000rmp 离心机离心 15min，弃上清，留沉淀，将装有细胞沉淀的离心管充分消毒，移入超净台上，用 RPMI1640 培养基重悬细胞，经 70μm 细胞过滤器过滤到六孔板中，均匀铺板，然后将六孔板放入细胞 37℃培养箱内进行细胞贴壁，贴壁 2h,取出六孔板，弃上清，贴壁细胞为小鼠肺巨噬细胞。

提取总 RNA 和 qRT-PCR：用 PBS 清洗 2 遍贴壁的肺巨噬细胞，按 RNA 提取试剂说明书从细胞中提取总 RNA。用分光光度法定量 RNA，调整 RNA 浓度在 500-1000ng/μl 之间并使其 260nm/280nm 的吸光度比值均在 1.8-2.0 之间。然后按照反转录试剂盒说明书将 1μg 的 RNA 反转录成 cDNA。然后再使用 LightCycler 480 system 对

中国知网 https://www.cnki.net

1μlcDNA 进行实时定量 PCR。β-actin 作为内参基因，使用 2-△△Ct 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列如下：

IL-1β	Upstream	TGCCACCTTTTGACAGTGATG
	Downstream	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
TNF-α	Upstream	ACCACGCTCTTCTGTCTACTG
	Downstream	ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-10	Upstream	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA
	Downstream	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
RIPK3	Upstream	CAGTGGGACTTCGTGTCCG
	Downstream	CAAGCTGTGTAGGTAGCACATC
β-actin	Upstream	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	Downstream	ATGGAGCCACCGATCCACA
MLKL	Upstream	TTAGGCCAGCTCATCTATGAACA
	Downstream	TGCACACGGTTTCCTAGACG
TREM2	Upstream	CTGGAACCGTCACCATCACTC
	Downstream	CGAAACTCGATGACTCCTCGG

2.2.8 MH-S 细胞细胞培养

选用 MH-S 细胞系作为体外实验实验细胞系，并在添加了 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基（完全培养基）中进行培养。置于 37°C 的含 5%CO2 和 95%空气湿化培养箱中培养，传代至对数生长期时进行实验。

2.2.9 CSE 的制备

每次细胞实验都使用新鲜制备的 CSE 溶液。具体制备方法如下：肺泡灌洗液瓶中加入 20ml 的无血清 RPMI-1640 培养基，将 1 支去除滤嘴的香烟（万宝路牌），连接在肺泡灌洗瓶盖连接短管的一端，长管的一端连接注射器，将香烟点燃后以恒

中国知网 https://www.cnki.net

定流速将烟雾吸引至培养基中直至一根香烟燃尽，将制备的CSE用注射器抽取出来用细菌过滤除菌进行过滤除菌。将 pH 调至 7.4 左右，然后将此 CSE 溶液认定为100%CSE，并用培养基按所需实验浓度进行稀释。

2.2.10 CCK-8 细胞活力检测

通过CCK8细胞活性检测评估不同浓度CSE对MH-S细胞活力值的影响。将MH-S细胞以 $8\times10^{\wedge4}$ 个/每孔的密度接种于96孔板中，培养12h，待细胞融合度到达70%时，对细胞进行不同香烟提取物（CSE）浓度（0、0.25%、0.5%、1%、2%）的处理，分组如下：仅含有培养基不含细胞的空白组、非干预组以及含有不同浓度 CSE 刺激的细胞组，培养 12h 后，弃去旧培养基，于每孔中加入新的基础培养基（无胎牛血清和青霉素/链霉素）100μl，再在每个孔中加入 10μl 的 CCK8 试剂，轻柔混匀后，待其于 37℃含有 5%CO_2 细胞培养箱中充分反应 30min 后，使用多功能酶标仪测量450nm 波长处的 OD 值，后续利用公式计算 MH-S 细胞活力，计算公式为：细胞相对活力=（实验组OD值-空白组OD值）/（对照组OD值-空白组OD值）×100%。

2.2.11 WB 检测 MH-S 细胞内蛋白表达情况

实验分组：将实验分为对照组和浓度分别为 0，0.25%，0.5%，1%，2%CSE 组；取对数生长期的 MH-S 细胞以 5×10^{6}cells/ml 的密度接种于 10cm 培养皿中，5ml 完全培养基/皿，均匀种板后将培养皿放入 37℃恒温 5%CO2 培养箱中培养 24h 确保细胞贴壁。24 小时后，弃去旧培养基，对照组中加入新的 5ml 完全培养基，CSE 组按照浓度梯度加入含有新鲜现配的 CSE 的完全培养基，培养 12h。

细胞蛋白提取：MH-S 细胞用 RIPA: PMSF: 磷酸酶抑制剂：蛋白酶抑制剂（100:1:1:1 比例配制）的混合物进行裂解。细胞裂解液在 4℃，12000rpm 下离心 30 分钟。然后采用 BCA 法测定细胞上清中总蛋白浓度：用蒸馏水稀释蛋白标准品，浓度梯度分别为2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml和0。按50：1 混合试剂 A 和试剂 B 配制 BCA 工作液，向 96 孔板中加入上述梯度浓度的标准品各 24μl，样本孔每孔加入 21μl 蒸馏水和 3μl 的蛋白样本，随后每孔加入配置好的BCA工作液200μl，37℃放置30分钟后用酶标仪检测562nm波长处的吸光度，根据标准品吸光度和已知浓度制作标准曲线，随后根据样品吸光度换算出蛋白浓度。每个样本中加入 5×loading buffer，后于 95-100℃的水浴锅中放置 5 分钟后变性，然后将变性好的蛋白样本置于-80℃冰箱中冻存，便于后续实验。

中国知网 https://www.cnki.net

WB 检测：根据实验分组，每组取等量的蛋白样本在 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离，然后将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭 1.5h，然后用抗体稀释液稀释一抗(抗 p-MLKL、p-RIPK3 均以 1:1000 稀释、抗 β-actin 1:1000 稀释)，4℃孵育过夜（孵育时间为 12h-16h 左右）。次日，用 TBST 清洗膜 3 次，每次 10 分钟，随后用二抗(5%脱脂牛奶 1:10000 稀释)在室温下摇床孵育 1 小时。弃去二抗，用 TBST 清洗膜 3 次，每次 10 分钟。配制 ECL 超敏发光液（A:B=1:1），应用 Bio-Rad 成像系统进行曝光和拍照，ImageJ 软件测量条带灰度值，各条带与 β-actin 的灰度值比值为蛋白相对表达量。

2.2.12 qRT-PCR 测定 MH-S 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-10mRNA 水平

实验分组：将实验分为对照组和浓度为 0，0.25%，0.5%，1%，2%CSE 组；取对数生长期的 MH-S 细胞以 1×10^6cells/ml 的密度接种于 6 孔板中，2ml/皿，均匀种板后将培养皿放入 37℃恒温 5% CO2 培养箱中培养 24h 确保细胞贴壁。24 小时后，弃去旧的培养基，对照组加入新的 2ml 完全培养基，CSE 组按照浓度梯度加入含有新鲜现配的 CSE 的培养基，培养 12h。

提取总 RNA 和 qRT-PCR：将刺激了 12h 的细胞从细胞培养箱里拿出并用 PBS 清洗 3 次，其余步骤同 2.2.4 部分。

2.2.13 生物信息学数据分析

从 Gene Expression Omnibus（GEO）数据库中下载慢阻肺相关的芯片 GSE8823。然后用 GEO2R（一个交互式网络工具，能够比较 GEO 数据库中的两组或多组样本，以筛选在不同实验条件下差异表达的基因，输出的结果按照基因显著性排序）对差异基因进行筛选，并对筛选基因进行两样本的 t 检验。然后，再基于 coexpedia 数据库，筛选了与 TREM2 共表达得分前 100 的基因。进一步通过 KOBAS 进行功能分析，以获得富集的生物学过程和通路。

2.2.14 小鼠 BALF 中肺巨噬细胞收集及流式检测

收集 BALF 的步骤同第一部分。收集的 BALF 用于流式细胞检测。将收集的 BALF 以 300g，4℃离心 10 分钟，弃上清，细胞沉淀用 PBS 重新洗涤 2 次。每只小鼠样本调整细胞数为 1×10^6 个细胞。留空白管后，将所有样本进行 FITC-CD11b 抗体(巨噬细胞表面标记物)、Percp-CD11c 抗体(肺巨噬细胞表面标记物)和 PE-TREM2 抗体的孵育（所有抗体均按照说明谁推荐比例稀释），避光 30 分钟。PBS 洗涤两次，300g，

中国知网 https://www.cnki.net

4℃离心 5 分钟，用 100ulPBS 重悬细胞，然后进行上机检测，并用 FlowJo 软件对数据进行分析。

2.2.15 使用 MLKL 抑制剂对 MH-S 细胞进行处理

6 孔板种板步骤同第二部分，种板 24h 后向除对照组之外的孔中加入溶解好的 MLKL 抑制剂，然后放回细胞培养箱内预处理 3h，3h 后取出孔板，在对应的孔板中加入 CSE，再放回细胞培养箱中培养 12h。12h 后取出孔板，用于后续实验。

2.2.16 对 MH-S 细胞进行小干扰 RNA（siRNA）转染

每 1nmol siRNA 加入 50μL 无菌无酶水，制成 20μM 溶液，即 20pmol/μL。细胞准备：转染前 24h，将 MH-S 细胞以 5×104 个/孔的细胞密度接种于六孔板中，并加入 2mLRPMI1640 完全培养基。24 小时后，当 MH-S 细胞融合度达到 70%，准备转染。在 250μL 的 Opti-MEM 培养基中加入 1000pmol siRNA，轻柔混匀；用 250μL Opti-MEM 培养基稀释 5μL lipofectamin 2000 转染试剂，轻柔混匀，室温放置 5 分钟。将稀释好的 siRNA 和 lipofectamin 试剂混合；轻柔混匀，室温放置 20 分钟,以便形成 siRNA/lipofectamin 复合物。将 500μL siRNA/lipofectamin 复合物加入到含有细胞培养板的孔中，来回轻柔摇晃细胞培养板。补全每个孔中的 Opti-MEM 培养基至 2ml。细胞在 37℃恒温含 CO2 的细胞培养箱中孵育 24 小时后，更换为 RPMI 1640 完全培养基，用于后续实验。

2.2.17 TREM2 敲减后 HIF-1α 抑制剂处理

TREM2 敲减后，弃去旧培养基，更换为新的 RPMI 1640 完全培养基，继续培养 24h，24h 后在 HIF-1α 抑制剂组中每孔加入 HIF-1α 抑制剂浓度为 4.8μM/ml，预处理 6h 后在原培养基中加入 CSE 继续刺激 12h，之后收集细胞用于后续实验。

2.2.18 统计学分析

采用 SPSS 软件包 19.0 版本对实验数据进行统计分析，使用 Graphpad Prism 9.0 对实验数据进行整理和图表绘制。所有数据采用平均数±标准差表示。两组样本间的均数比较采用独立样本 t 验，多样本间均数比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

中国知网 https://www.cnki.net

3 结 果

3.1 香烟烟雾诱导小鼠肺气肿造模成功

如图 1A 所示，对照组肺组织 HE 染色显示完整肺结构，表现为均匀分布的薄层肺间隔和清晰的肺轮廓。相比之下，熏烟组呈现出典型肺气肿病理特征：肺壁断裂伴结构塌陷；肺腔异常扩张形成肺气肿；定量分析显示，熏烟组 MLI (114.2±25.91) μm 和 MAA （ 1975±1349 ） μm^2 均较对照组 MLI （ 34.47±4.065 ） μm 和 MAA(12472±1044）μm^2 显著增加（P<0.001, 图 1B）。

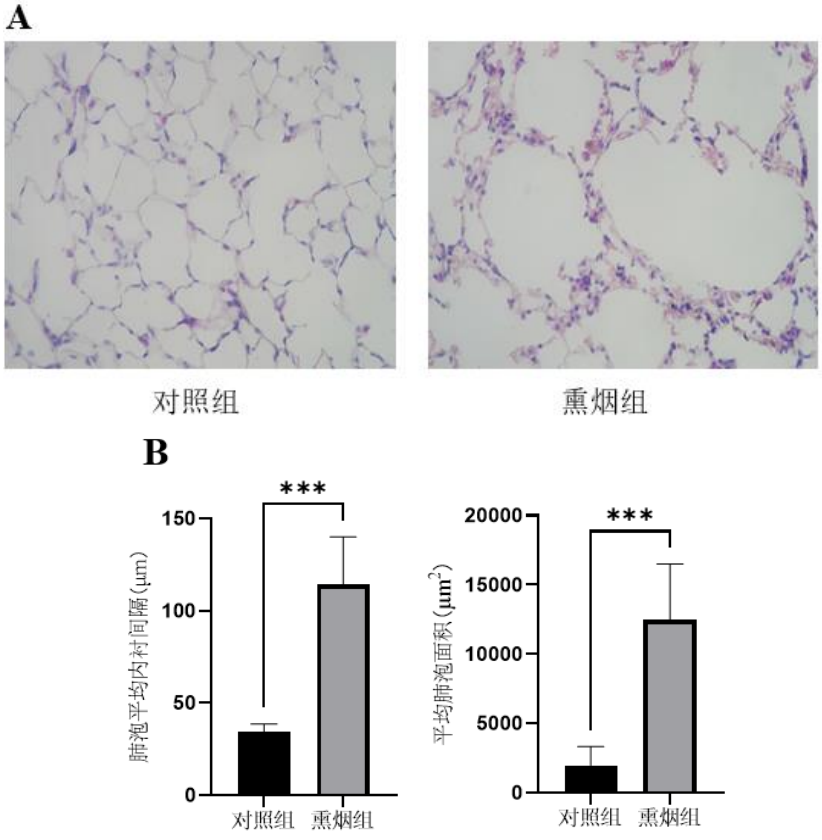


图 1.香烟烟雾诱导小鼠肺气肿

注：A.小鼠肺组织病理学 HE 染色（400×）；B.HE 染色 MLI、MAA 分析结果，与对照组相比，$^{***}P$＜0.001。

3.2 香烟烟雾诱导肺巨噬细胞的炎症反应和坏死性凋亡

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.1 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞炎症因子表达

我们采用 qRT-PCR 检测了肺巨噬细胞中炎性细胞因子（TNF-α、IL-1β）及抗炎因子 IL-10 的 mRNA 表达水平。实验结果显示，与对照组相比，香烟烟雾暴露组小鼠肺巨噬细胞中促炎因子 TNF-α 和 IL-1β 的表达量显著升高；同时，抗炎因子 IL-10 的表达亦呈现统计学意义的增长趋势（P<0.01）（图 2）。

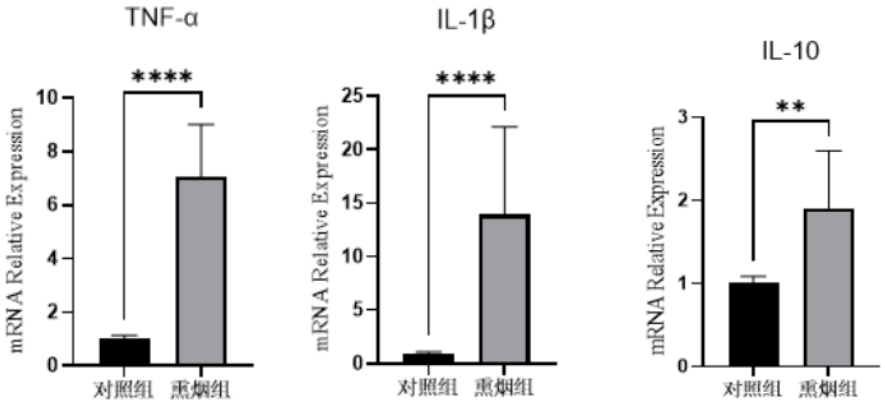


图 2. 熏烟对小鼠肺巨噬细胞中炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-10 的影响。

注：与 对照组相比，$^{**}P$＜0.01，$^{****}P$<0.001。

3.2.2 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡核心蛋白的表达

用小鼠肺组织冰冻切片对 p-MLKL 进行免疫荧光染色，F4/80 抗体（红色荧光标记）特异性标记肺巨噬细胞，同时联合 p-MLKL 抗体（绿色荧光标记）进行标记。定量分析显示，熏烟组小鼠肺巨噬细胞中 p-MLKL 荧光信号强度较对照组显著增强（图 3A）。为验证此发现，我们进一步采用免疫组化对平行样本进行检测，结果显示熏烟组小鼠肺组织巨噬细胞 p-MLKL 的 IOD 显著高于对照组（p<0.01），该定量结果与免疫荧光数据一致（图 3D）。

中国知网 https://www.cnki.net

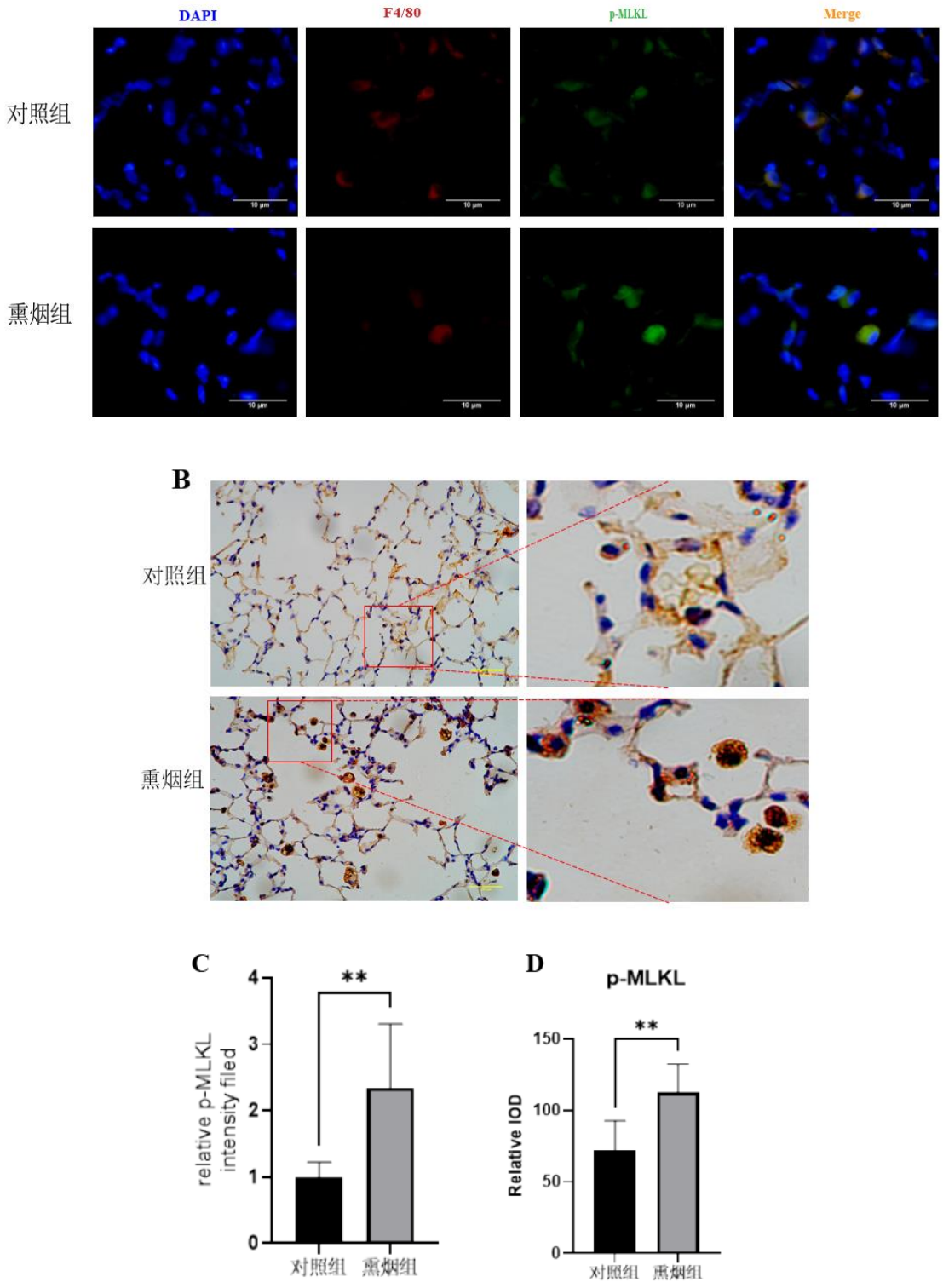


图 3. 香烟烟雾刺激小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡核心蛋白表达

注：A.对照组与熏烟组小鼠肺组织冰冻切片肺巨噬细胞免疫荧光，F4/80 为红色，p-MLKL 为绿色（400×），B.小鼠肺组织中肺巨噬细胞免疫组织化学染色（400×）。C. 对照

中国知网 https://www.cnki.net

组、熏烟组小鼠肺巨噬细胞中 p-MLKL 的荧光强度进行统计，与对照组相比，$^{**}P<0.01$。D. 对 p-MLKL 累计光密度（IOD）进行统计，$^{**}P<0.01$ 差异具有统计学意义。

3.2.3 不同浓度 CSE 对 MH-S 细胞活性的影响

如图 4 所示，CCK-8 实验结果显示，CSE 对 MH-S 细胞活力呈现时间和浓度依赖性抑制效应。当分别给予 0、0.25%、0.5%、1%、2%CSE 处理 12h 后，各浓度组细胞活力均显著降低。

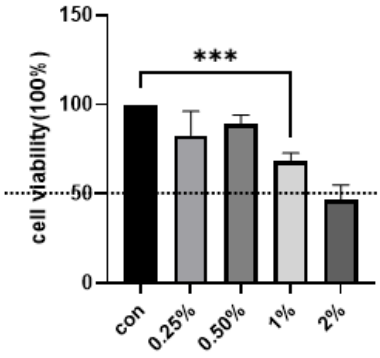


图 2. 不同浓度 CSE 处理 MH-S 细胞 12h 后的细胞活力检测

注：与 对照组相比，$^{***}P<0.001$ 。

3.2.4 CSE 促进了 MH-S 细胞中炎症因子的表达

随后，我们又用 qRT-PCR 检测了 CSE 处理后的 MH-S 细胞炎症相关细胞因子 mRNA 表达水平。结果如图 5 所示，CSE 刺激可显著上调 TNF-α、IL-1β 和 IL-10 的转录表达。

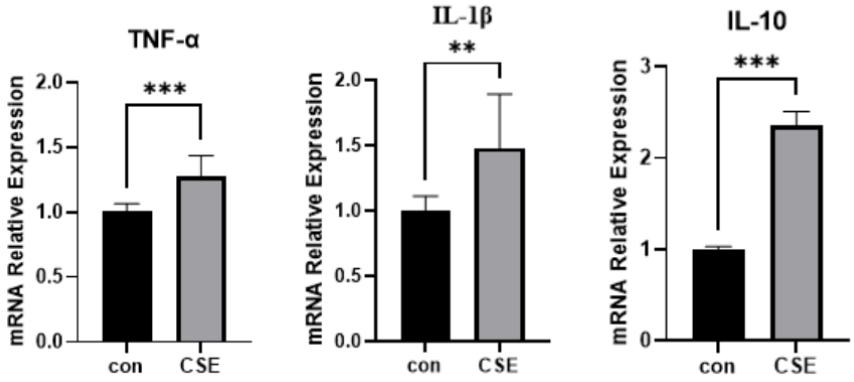


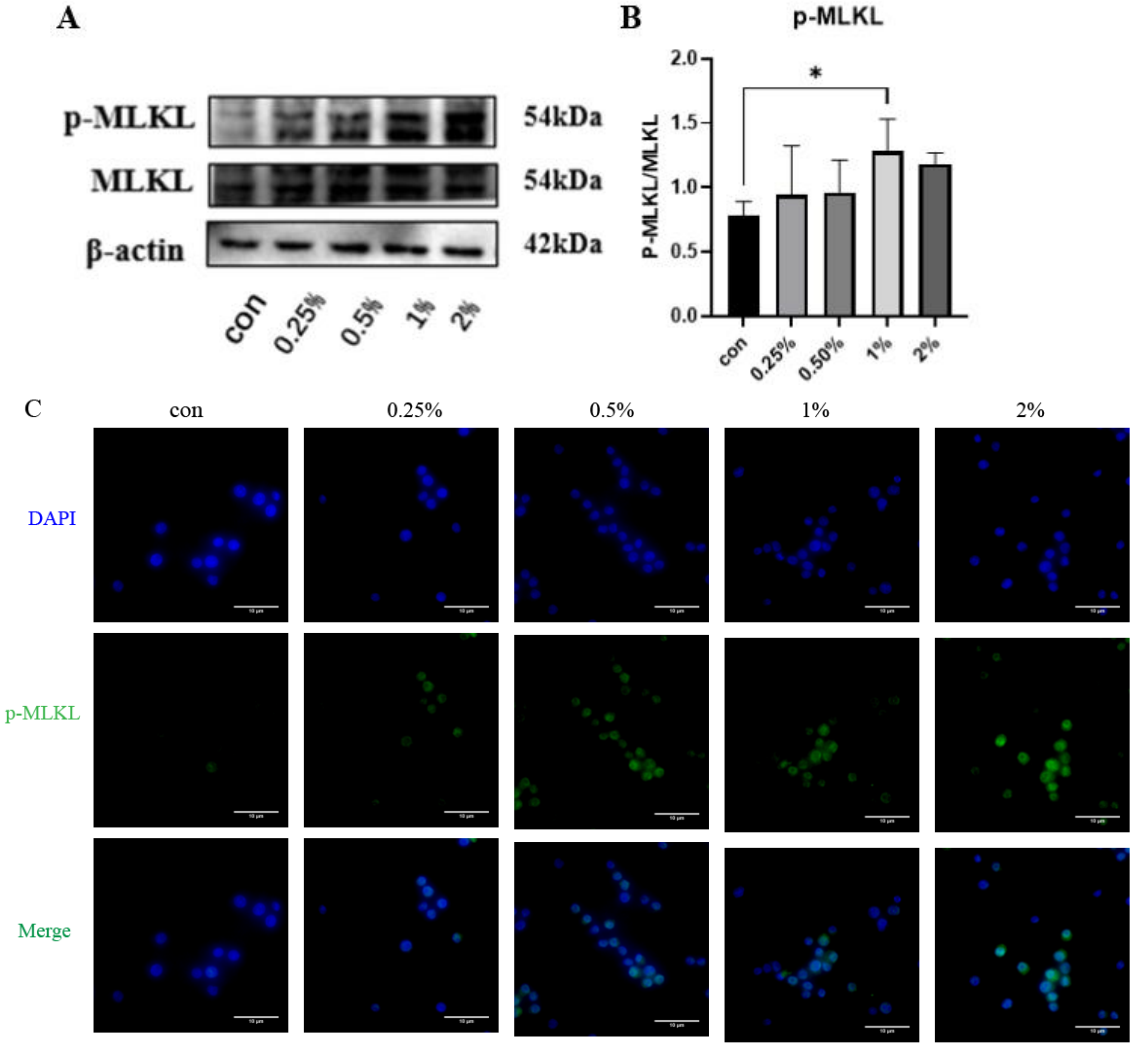
图 5. CSE 刺激 MH-S 细胞系后用 qRT-PCR 检测细胞内炎症因子表达情况

注：与对照组相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.5 CSE 促进 MH-S 细胞坏死性凋亡相关蛋白表达

体外实验进一步验证 CSE 对 p-MLKL 的调控作用。WB 分析显示，随着 CSE 处理浓度梯度升高（0、0.25%、0.5%、1%、2%），MLKL 磷酸化水平呈现剂量依赖性增强（$P<0.05$），而总 MLKL 蛋白水平未发生显著改变（图 6A）。为确认此结果，我们又进行了免疫荧光检测，结果显示 CSE 处理组 p-MLKL 荧光强度显著增强并且与 WB 结果高度一致（图 6B）。为进一步阐明其作用机制，我们采用 WB 技术检测了坏死性凋亡通路上游关键调控因子——受体相互作用蛋白激酶 3（RIPK3）的表达变化。结果显示，CSE 暴露可显著诱导 RIPK3 磷酸化，而 RIPK3 总蛋白表达水平在不同浓度处理组间未见明显变化（图 6E）。这一现象提示 CSE 可能通过特异性激活 RIPK3-MLKL 信号轴磷酸化级联反应，而非通过调控相关蛋白表达量来触发细胞的坏死性凋亡。



中国知网 https://www.cnki.net

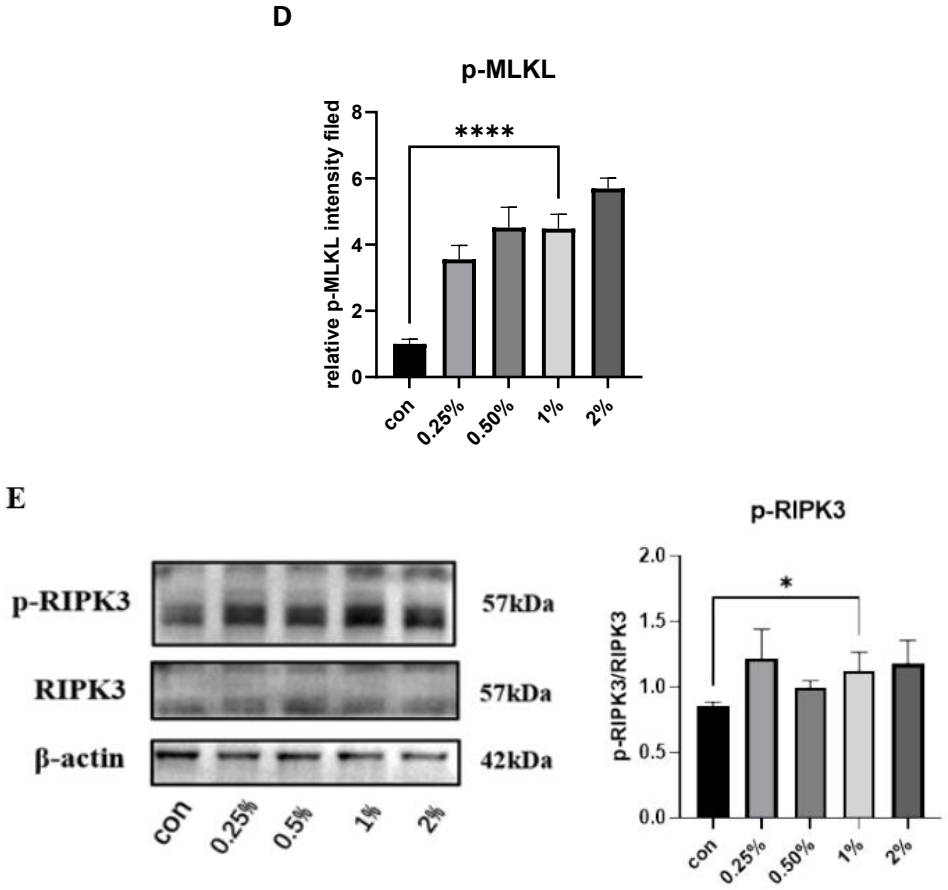


图 6. CSE 能够引起 MH-S 细胞中坏死性凋亡相关蛋白表达升高

注：A.WB 检测不同浓度的 CSE 刺激 MH-S 细胞后 p-MLKL 的蛋白表达;B 对图 A 中的蛋白表达量灰度值进行计算，与对照组相比，$^{*}P<0.05$；C. 免疫荧光检测不同浓度的 CSE 刺激 MH-S 细胞后 p-MLKL 的荧光强度，蓝色为 DAPI, 绿色为 p-MLKL（400×）。D.免疫荧光定量分析，与对照组相比，$^{****}P<0.001$。E.WB 检测 p-RIPK3 蛋白表达量随 CSE 浓度的变化而变化。与对照组相比，$^{*}P<0.05$。

3.2.6 抑制 MLKL 能够减轻 CSE 引起的 MH-S 细胞的死亡和炎症反应

我们通过用坏死性凋亡核心蛋白 MLKL 的特异性抑制剂 GW806742X 对 CSE 刺激的 MH-S 细胞进行干预。采用 CCK-8 法检测细胞活力值如图 7A 所示，与 CSE 单独处理组相比，CSE+GW806742X 联合处理组细胞存活率显著提升（$P<0.001$）；而单纯 GW806742X 处理组与联合处理组间未呈现统计学显著差异。与单纯 CSE 组相比，CSE+GW806742X 联合处理组中 TNF-α 的 mRNA 水平差异不具有统计学意

中国知网 https://www.cnki.net

义，而 IL-1β 和 IL-10 的 mRNA 明显降低。说明 GW806742X 的确逆转了 CSE 诱导的 MH-S 细胞的死亡（图 7B）。

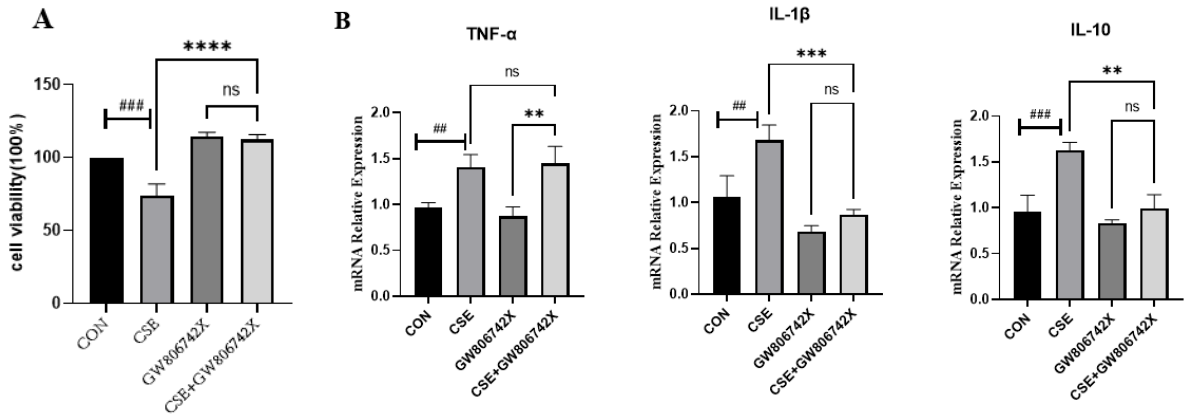


图 7. 抑制 MLKL 能够减轻 CSE 引起的 MH−S 细胞的死亡和炎症反应

注：A.CCK−8 检测坏死性凋亡抑制剂 GW806742X 作用后细胞存活情况；与对照组相比$^{\#\#}$ $P<$ 0.01，与 CSE 组相比$^{****}P<$ 0.001，ns $P>0.05$；B. 坏死性凋亡抑制剂 GW806742X 作用后细胞中炎症因子表达情况；与对照组相比$^{\#\#}$ $P<$ 0.01，$^{\#\#\#}$ $P<$ 0.01，与 CSE 组相比$^{**}P<$ 0.01，$^{***}P<$ 0.001，ns $P>0.05$。

3.3 TREM2 在香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应中具有重要作用

3.3.1 香烟烟雾诱导的慢阻肺模型中肺巨噬细胞的差异基因表达情况

基于 GEO 数据库挖掘慢阻肺相关的芯片 GSE8823，包含 11 例正常非吸烟者和 13 例正常吸烟者的肺巨噬细胞样本数据。T 检验结果显示 TREM2 在吸烟者肺巨噬细胞样本中显著上调（图 8）。

中国知网 https://www.cnki.net

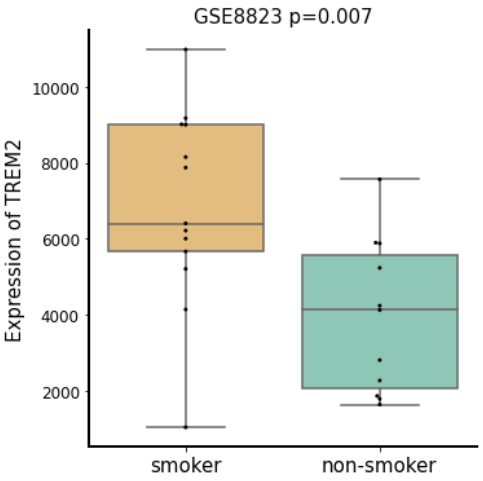


图 8.GEO 数据库的分析吸烟患者与正常人肺巨噬细胞中 TREM2 基因的差异表达。

注：$P<0.05$，差异具有统计学意义。

3.3.2 香烟烟雾促进小鼠肺巨噬细胞 TREM2 的表达

为系统评估烟雾暴露对肺巨噬细胞中 TREM2 表达的影响，我们通过流式细胞术对 BALF 来源肺巨噬细胞的 TREM2 蛋白表达进行定量分析。结果显示：流式细胞荧光强度分布显示暴露组肺巨噬细胞群体明显右移（图 9A），提示细胞表面 TREM2 蛋白表达量整体增加；TREM2 阳性肺巨噬细胞比例在暴露组显著高于对照组（$P<0.001$）（图 9B）。我们用 qRT-PCR 检测了小鼠肺巨噬细胞中 TREM2 转录水平。结果显示，烟雾暴露组小鼠肺巨噬细胞中 TREM2 mRNA 表达量较对照组显著升高（$P<0.001$）（图 9C）。qRT-PCR 与流式细胞术检测结果一致，共同证实烟雾暴露可显著上调肺巨噬细胞中 TREM2 的表达。

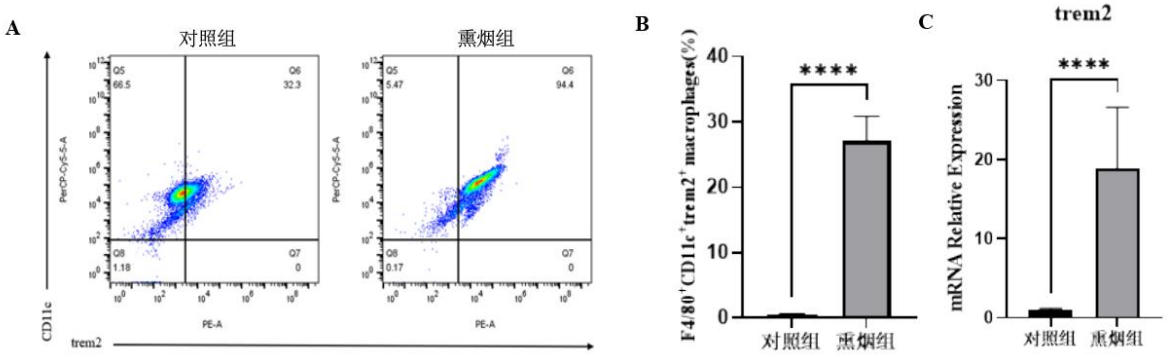


图 9.熏烟小鼠肺巨噬细胞 TREM2 表达变化

中国知网 https://www.cnki.net

注：A.TREM2 阳性细胞流式细胞图;B.BALF 流式检测对照小鼠和熏烟小鼠肺巨噬细胞中 TREM2 阳性细胞情况；与对照组相比，$^{****}P<0.001$。C.qRT-PCR 检测肺巨噬细胞中 TREM2 的转录水平；与对照组相比，$^{****}P<0.001$。

3.3.3 CSE 促进 MH-S 细胞中 TREM2 的表达

然后我们采用 CSE 对 MH-S 进行梯度浓度干预，系统评估 TREM2 蛋白表达。实验数据显示：在 12h 持续暴露模型中，TREM2 蛋白表达呈现剂量依赖性的双相变化趋势——低浓度 CSE（0.25%、0.5%、1%）刺激下表达显著上调，而高浓度组（2%）则出现显著表达抑制（图 10）。通过整合细胞活力检测结果与上述剂量效应关系，本研究最终确立 1% CSE 浓度、12h 暴露时程为最佳干预参数，可诱导 TREM2 表达达峰值水平，故选择此参数组合用于后续信号通路机制研究。

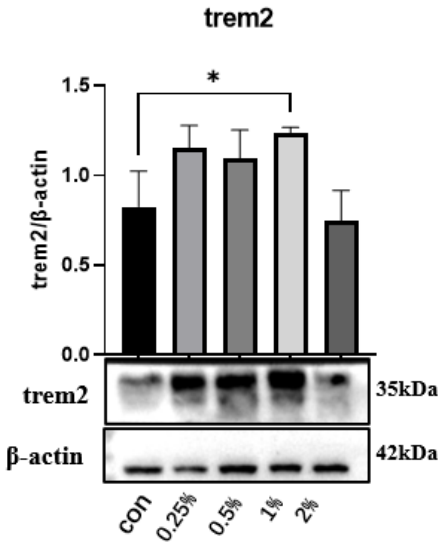


图 10 不同浓度 CSE 刺激 MH−S 细胞系 12h 后 WB 检测 TREM2 蛋白表达量变化；

注：与 对照组相比，$^{*}P<0.05$。

3.3.4 生信分析寻找 TREM2 和坏死性凋亡的潜在互作靶点

上述研究已证实香烟烟雾可诱导肺巨噬细胞发生坏死性凋亡并且 TREM2 可以调控香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞死亡。基于此发现，我们进一步提出科学假设：TREM2 受体调控肺巨噬细胞死亡的作用机制可能经由经典坏死性凋亡信号通路 RIPK3/MLKL 轴介导。为验证该假说，我们首先基于 coexpedia 数据库，筛选了与 TREM2 共表达得分前 100 的基因。进一步通过 KOBAS 进行功能分析，KEGG 结果发现与凋亡、B 细胞受体信号通路、Fc - epsilon - RI 信号通路、动物自噬、神经活

中国知网 https://www.cnki.net

性配体-受体相互作用、IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞粘附分子（CAMs）、坏死性凋亡等功能显著相关（图 11）。

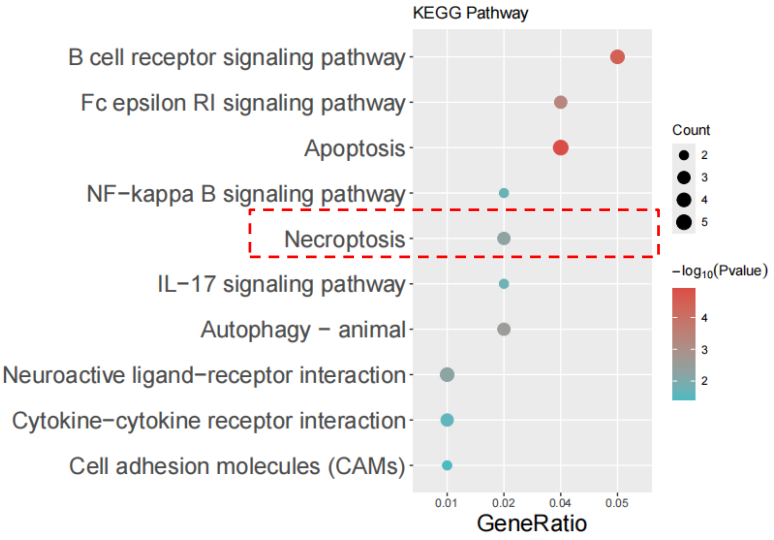


图 11 基于 coexpedia 数据库对 TREM2 与坏死性凋亡进行功能富集

3.3.5 敲减 TREM2 后能够抑制 CSE 引起的 MH-S 细胞死亡

为进一步探究 TREM2 在 MH-S 细胞死亡中的作用机制，我们进一步对 MH-S 细胞进行 TREM2 的敲减，然后通过 CCK-8 法检测发现：相较于 NC 组及 CSE+NC 组，TREM2 siRNA 干预组（TREM2siRNA 组和 CSE+TREM2siRNA 组）均表现出显著增强的细胞存活率（$P<0.05$）。值得注意的是，CSE+TREM2siRNA 组与单纯 TREM2siRNA 组间的细胞活力差异无统计学意义（$P>0.05$），提示 TREM2 表达下调不仅能有效拮抗 CSE 诱导的细胞毒性效应，且在 TREM2 沉默状态下，外源性 CSE 刺激未能进一步加剧细胞死亡进程（图 12）。

中国知网 https://www.cnki.net

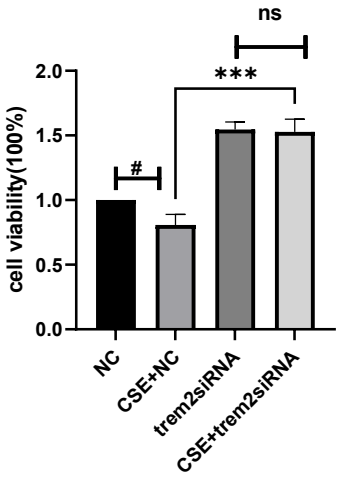


图 12.CCK−8 检测敲减 TREM2 后 CSE 刺激 MH−S 细胞细胞活力值的变化；

NC:阴性对照；CSE:香烟提取物

注：与 NC 组相比，$^{\#}P<0.05$； CSE+TREM2siRNA 组与 CSE+NC 组相比，$^{***}P<0.001$；CSE+TREM2siRNA 组与 TREM2siRNA 相比，ns$P>0.05$。

3.3.6 敲减 TREM2 后能够逆转 CSE 诱导的 MH-S 细胞中炎症因子的表达升高

为验证 TREM2 基因敲减对 CSE 诱导炎症反应的影响，我们采用 qRT-PCR 技术检测了 MH-S 细胞中关键炎症因子的表达水平。结果显示：相较于 CSE+NC 组，CSE+TREM2 siRNA 组中 TNF-α 的 mRNA 转录水平未呈现显著差异（$P>0.05$）；而 IL-1β 和 IL-10 的表达量都显著下降并且差异均具有统计学意义（图 13）。

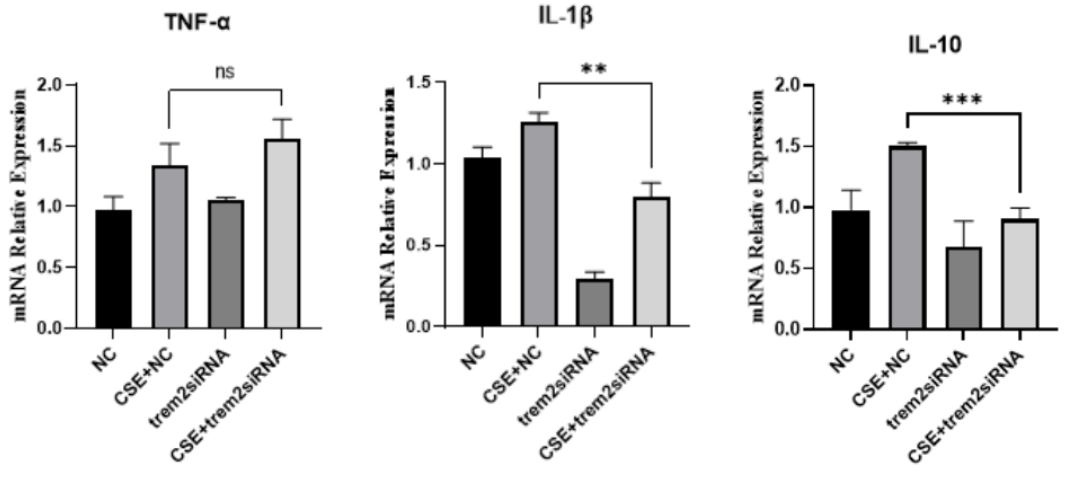


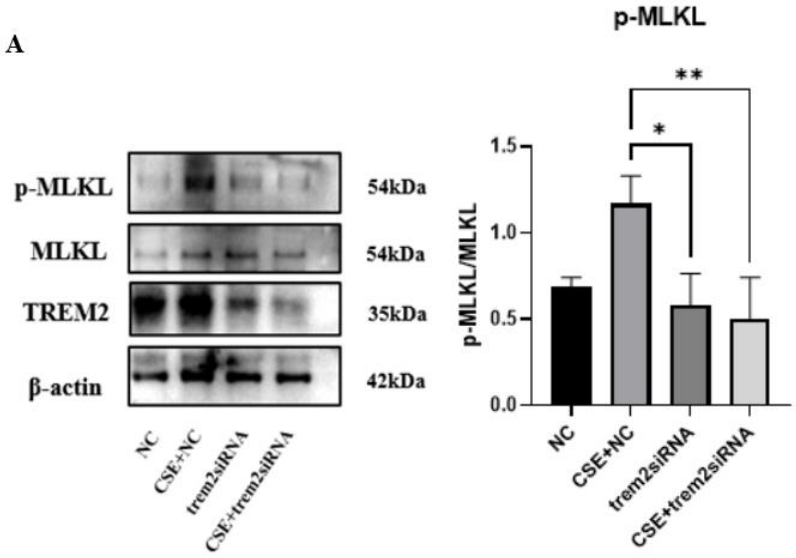
图 13. CSE 刺激 MH−S 细胞系后用 qRT-PCR 检测细胞内 TNF-α、IL-1β 和 IL-10 转录水平

注：与对照组相比， $^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，ns$P>0.05$。

中国知网 https://www.cnki.net

3.3.7 敲减 TREM2 后能够逆转 CSE 诱导的 MH-S 细胞坏死性凋亡相关蛋白表达升高

为了验证上述生信结果，我们又在敲减 TREM2 的基础上对坏死性凋亡核心蛋白 p-RIPK3 和 p-MLKL 进行了检测。如图 14A 所示，经过 TREM2 siRNA 转染后，无论是否给予 CSE 刺激（TREM2 siRNA 组及 CSE+TREM2 siRNA 组），p-MLKL 蛋白表达均较 CSE+NC 组显著降低（$P<0.01$），并且 CSE 刺激并未引起 TREM2 敲减组（CSE+TREM2 siRNA 组）p-MLKL 蛋白水平的进一步升高。这些数据表明，TREM2 基因沉默可有效逆转 CSE 暴露诱导的 MH-S 细胞 p-MLKL 的异常激活。为增强实验结论的可靠性，我们进一步用免疫荧光对 p-MLKL 的亚细胞定位及表达强度进行可视化验证，结果显示各实验组间变化趋势与 WB 结果高度一致（图 14B）。此外，对坏死性凋亡通路中另一关键调控因子 p-RIPK3 的检测发现，其蛋白表达水平的变化模式与 p-MLKL 呈现显著正相关性（图 14C），进一步佐证了 TREM2 在 CSE 诱导的坏死性凋亡通路中的调控作用。



中国知网 https://www.cnki.net

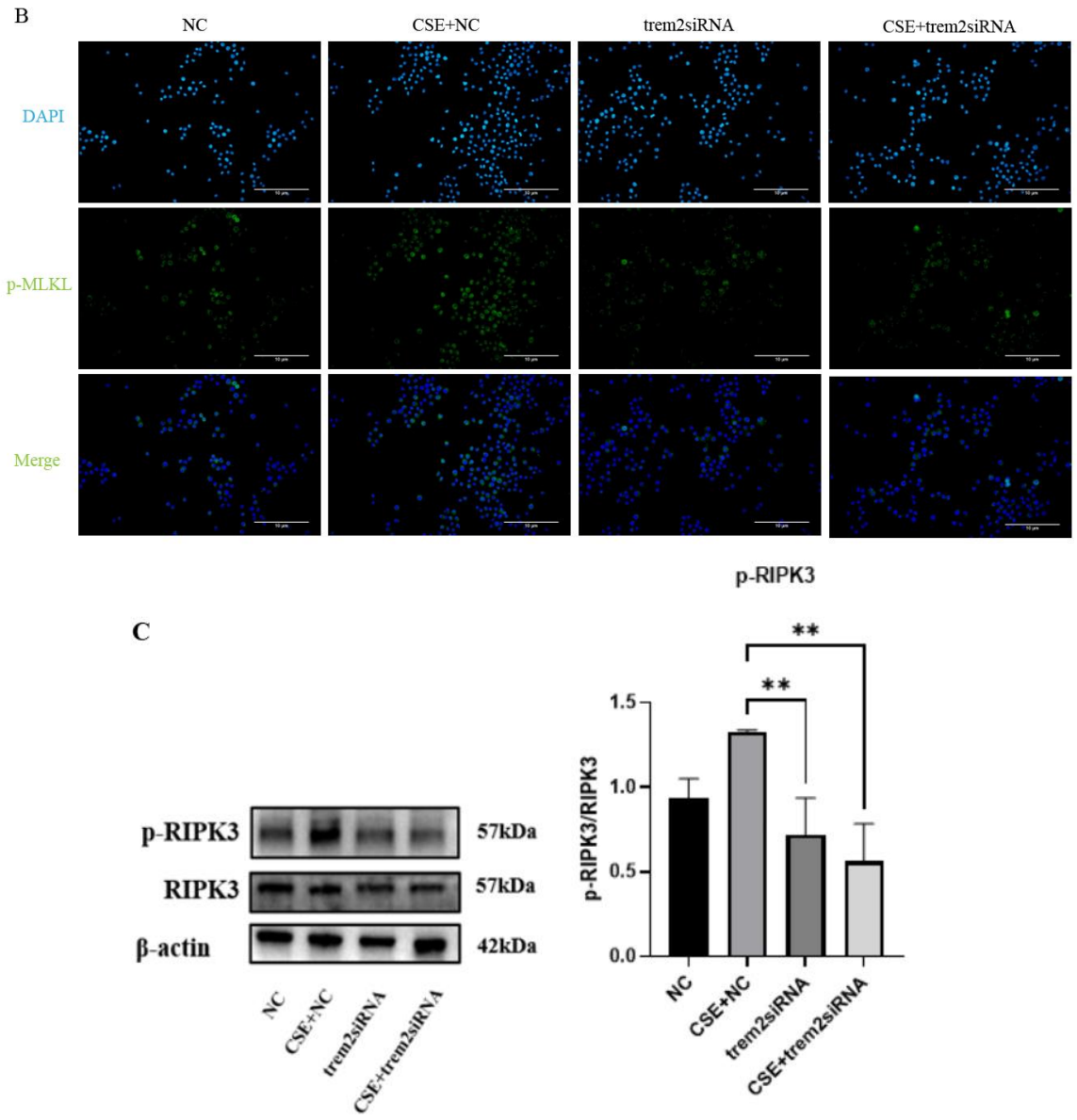


图 14. 敲减 TREM2 后对坏死性凋亡核心蛋白 p-RIPK3 和 p-MLKL 的影响

注：A.WB 检测 CSE 刺激的敲减了 TREM2 后 MH-S 细胞中 p-MLKL 蛋白表达量；与 CSE+NC 组相比，$^{*}P<0.05$；与 CSE+NC 组相比，$^{**}P<0.01$；B.免疫荧光检测敲减 TREM2 后与阴性对照组相 p-MLKL 的荧光强度，蓝色：DAPI，绿色：p-MLKL。C. WB 检测 CSE 刺激的敲减了 TREM2 后 MH-S 细胞中 p-RIPK3 的蛋白表达量；与 CSE+NC 组相比，$^{**}P<0.01$。

3.4 TREM2 通过调控 HIF-1α 进而促进了香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应

3.4.1 香烟烟雾诱导的慢阻肺模型中肺巨噬细胞差异基因表达情况

中国知网 https://www.cnki.net

基于 GEO 数据库挖掘慢阻肺相关的芯片 GSE8823，包含 11 例正常非吸烟者和 13 例正常吸烟者的肺巨噬细胞样本数据。T 检验结果显示 HIF-1α 在吸烟者肺巨噬细胞样本中显著下调（图 15）。

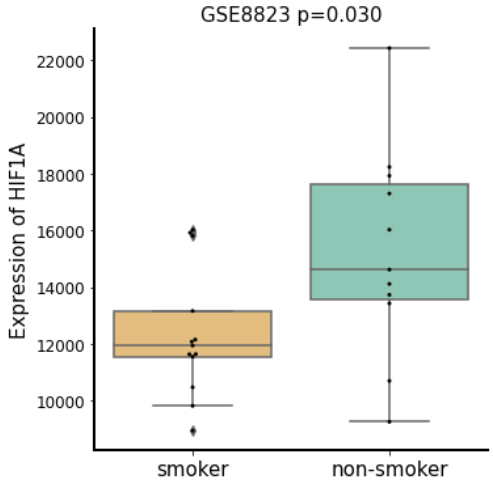


图 15. GEO 数据库的分析吸烟患者与正常人肺巨噬细胞中 HIF-1α 基因的差异表达。

注：$P<0.05$，差异具有统计学意义。

3.4 2 敲减 TREM2 能够上调 CSE 诱导的 MH-S 细胞中 HIF-1α 的表达

如图 16A 所示，与对照组相比，CSE 组中 HIF-1α 的蛋白表达量降低。然后我们进一步敲低 TREM2 后继续观察 HIF-1α 的蛋白表达量，结果显示：TREM2siRNA 能够部分逆转 CSE 诱导的肺巨噬细胞中 HIF-1α 的表达，使 HIF-1α 的蛋白表达水平较 CSE+NC 组升高（图 16B）。

中国知网 https://www.cnki.net

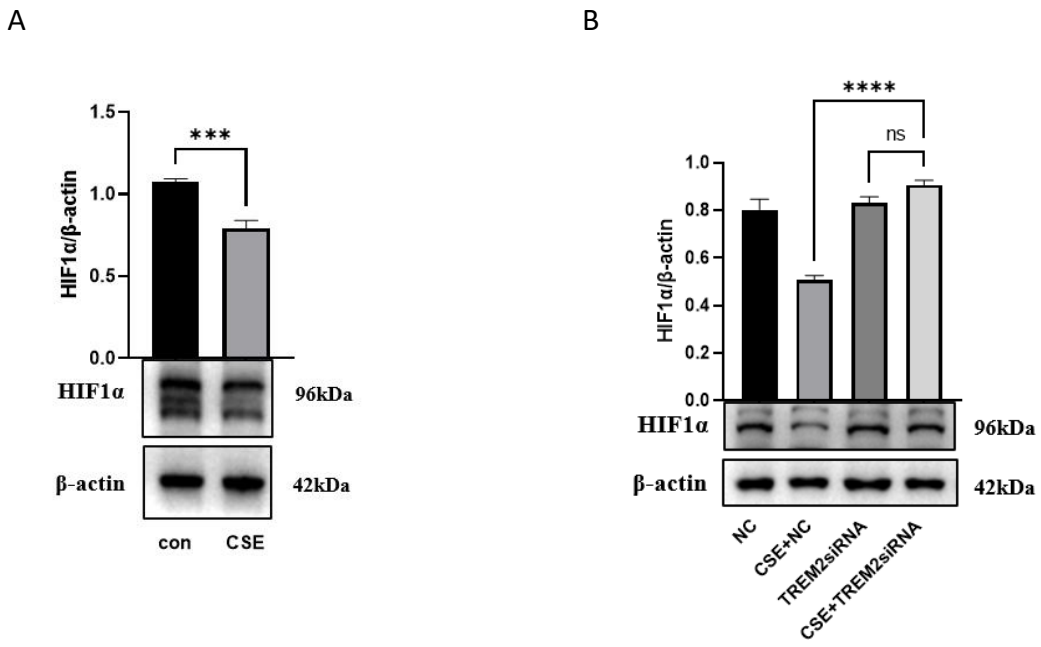


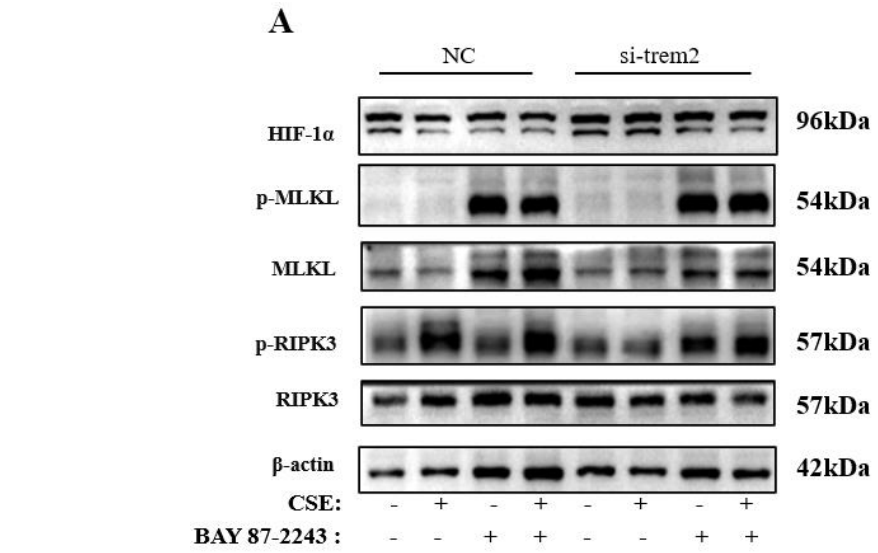
图 16.敲减 TREM2 后 HIF-1α 的蛋白表达情况

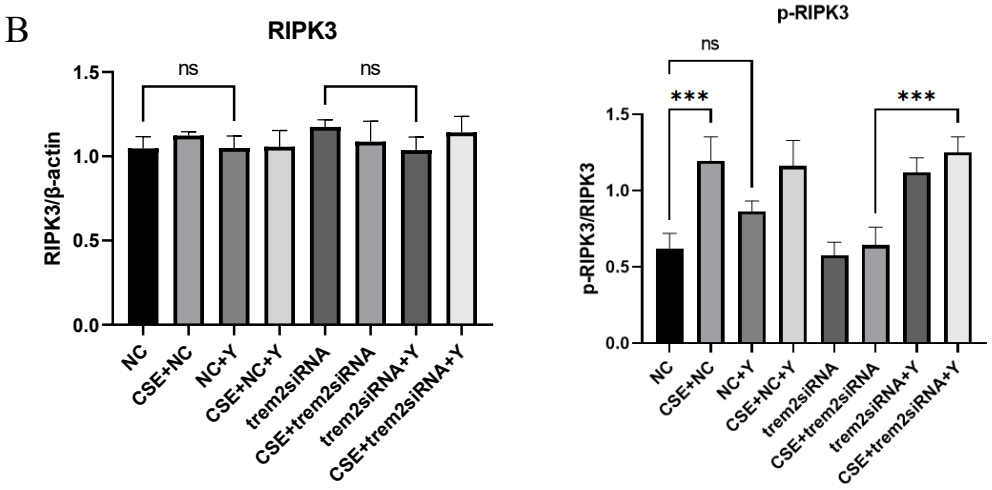
注：A. WB 检测 CSE 刺激后 HIF−1α 的变化；$^{***}P$＜0.01；B.WB 检测 TREM2 敲减后经 CSE 刺激 HIF-1α 的变化；与 CSE+NC 组相比，$^{***}P$＜0.001，与 TREM2+siRNA 组相比，ns$P$ >0.05。

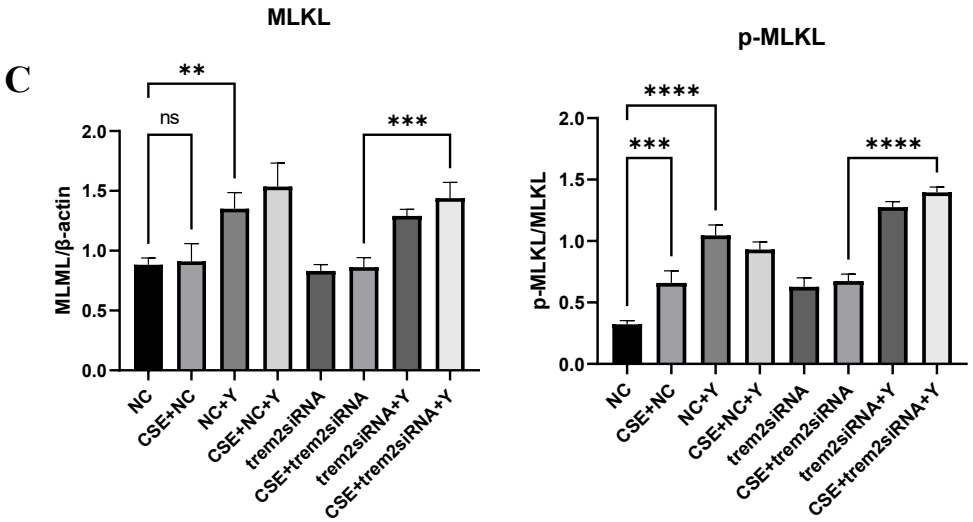
3.4.3 TREM2 通过下调 HIF-1α 的表达激活 CSE 诱导的 MH-S 细胞坏死性凋亡进而促进炎症反应

为进一步探究 HIF-1α 信号通路在坏死性凋亡中的作用机制，我们在 TREM2 敲减模型基础上联合应用 HIF-1α 特异性抑制剂 BAY 87-2243，通过 WB 检测坏死相关信号分子表达变化。如图 17A 所示，实验结果显示，与阴性对照组相比，TREM2siRNA+抑制剂组中 p-RIPK3 蛋白水平显著上调（P<0.001），而总 RIPK3 蛋白表达量在抑制剂干预后未见统计学差异（P>0.05）（图 17B）。另外，BAY 87-2243 处理诱导的 MLKL 蛋白表达呈现出增强效应（图 17C），其磷酸化形式 p-MLKL 的变化趋势与 p-RIPK3 具有显著相关性。最后，我们用 qRT-PCR 检测 TREM2 敲减模型联合应用 HIF-1α 特异性抑制剂 BAY 87-2243 后 MH-S 细胞中炎症因子表达水平，结果如图（17D）所示，与 TREM2siRNA+Y 组相比，CSE+TREM2siRNA+Y 组 TNF-α、IL-1β 的表达水平明显升高；而 IL-10 呈现出显著抑制效应。上述结果说明 HIF-1α 抑制剂 BAY 87-2243 能够逆转敲减 TREM2 对坏死性凋亡的抑制作用，从而促进小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡的发生和炎症反应的增大。

中国知网 https://www.cnki.net







中国知网 https://www.cnki.net

D

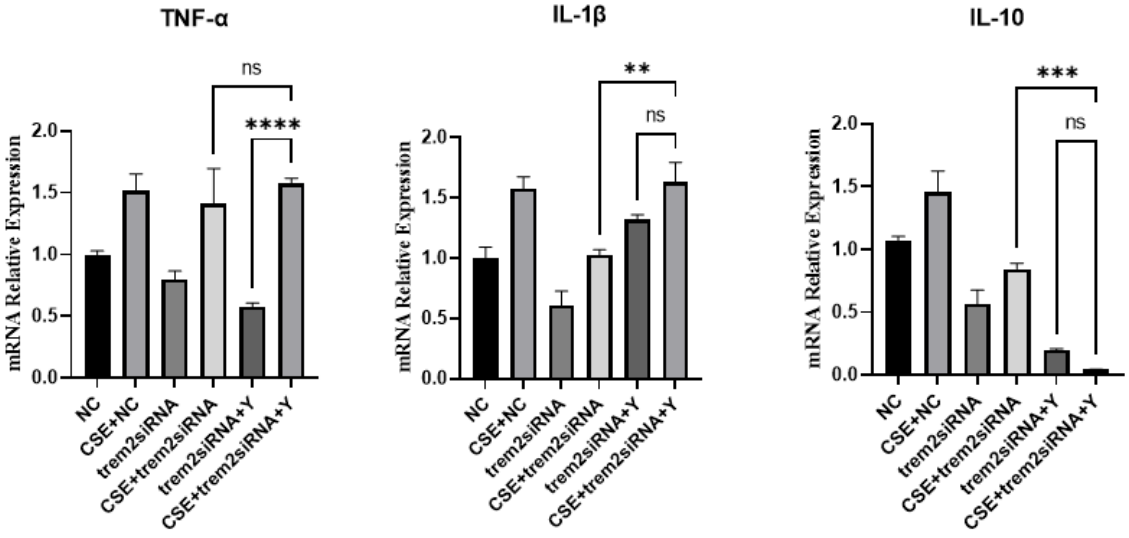


图 17. TREM2 通过下调 HIF-1α 进而激活坏死性凋亡相关蛋白最终促进炎症反应。

注：A. 对 MH−S 细胞进行 TREM2 敲减后加入 HIF−1α 抑制剂 BAY 87−2243 对坏死性凋亡通路蛋白表达量进行 WB 检测；B. 对图 A 中的 RIPK3、p−RIPK3 的蛋白表达量进行统计；Y: BAY 87−2243；与 TREM2siRNA 组相比，ns $P>0.05$，与 CSE+TREM2siRNA 组相比，$^{***}P<0.001$； C. 根据图 A，TREM2 敲减后加入 HIF-1α 抑制剂 BAY 87−2243 对 MH−S 细胞中的 MLKL、p−MLKL 蛋白表达量进行统计，与 NC 组相比，ns$P>0.05$，$^{**}P<0.01$， $^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.001$。D. qRT-PCR 检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 水平，与 TREM2siRNA+Y 组相比，ns$P>0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.001$。

中国知网 https://www.cnki.net

4 讨 论

吸烟作为慢阻肺、肺气肿及肺癌等呼吸系统疾病的核心致病因素，其病理机制较为复杂[40]。香烟烟雾中包含的活性氧化物及致癌物质可通过多重机制诱发肺组织损伤[41]，包括直接破坏肺上皮屏障功能、抑制固有免疫应答以及驱动持续性炎性微环境形成[42]。其中，肺巨噬细胞作为肺实质内重要的免疫监视细胞，在香烟烟雾诱导的病理过程中扮演双重角色：既通过吞噬清除外来颗粒维持组织稳态，又通过分泌细胞因子网络介导炎症级联反应[43]。

与凋亡不同的是，坏死性凋亡通过 RIPK1-RIPK3-MLKL 信号轴触发细胞膜破裂，释放 DAMPs，如 HMGB1、ATP 及 S100 蛋白等[44]。这些内源性危险信号可被邻近细胞的模式识别受体识别，促进 TNF-α、IL-6 等促炎因子转录[45]]。这种由细胞死亡驱动的炎症放大机制被称为“坏死性炎症”，在慢阻肺中尤为显著[46]。

在本研究中，我们通过构建小鼠香烟烟雾暴露模型，探究了 TREM2 在香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症的作用。我们的实验结果显示，香烟烟雾暴露显著上调肺巨噬细胞 RIPK3、MLKL 磷酸化表达水平和炎症因子转录水平。体外试验中 CSE 同样能够刺激 MH-S 细胞中 p-RIPK3、p-MLKL 的表达升高。并且我们进一步使用 MLKL 的特异性抑制剂对 CSE 刺激的 MH-S 细胞进行坏死性凋亡抑制，发现抑制剂的确能够逆转 CSE 诱导的 MH-S 细胞死亡。以上结果证实了香烟烟雾能够通过坏死性凋亡信号途径诱导肺巨噬细胞的死亡。

为了研究 TREM2 在调节坏死性凋亡和炎症反应中的作用，我们使用 siRNA 敲低肺巨噬细胞中的 TREM2 后观察坏死性凋亡信号通路分子的变化情况。首先，我们又对吸烟者和非吸烟者肺泡巨噬细胞中 TREM2 的表达进行了生信分析，并用流式和 qRT-PCR 证明了 TREM2 在香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞中上调。但是在我们的研究中发现的一个有趣的现象是在高浓度的 CSE 刺激下 TREM2 的表达出现下调的趋势。TREM2 能够识别多种配体，包括凋亡细胞、脂质以及某些 DAMPs[47]。在低浓度 CSE 刺激条件下，MH-S 细胞可能受到轻微的氧化应激或损伤，而 TREM2 表达的上调可能通过促进损伤产物的清除，从而维持细胞稳态并抑制过度的炎症反应[48]。已有研究表明，TREM2 的激活通常可促进巨噬细胞向 M2 型极化，而 M2 型巨噬细胞在抑制炎症反应和促进组织修复中发挥关键作用 [49]。因此，在低浓度 CSE 刺激

中国知网 https://www.cnki.net

下，TREM2 表达的增加可能反映了巨噬细胞试图通过上调抗炎因子（如 IL-10）来应对烟雾暴露诱导的炎症刺激[50]。然而，当 CSE 浓度升高至 2%时，TREM2 的表达呈现下降趋势，这可能与高剂量有害刺激诱导的巨噬细胞 M1 型极化及强烈的促炎反应有关[51]。在此情况下，持续的促炎微环境（如 TLR/NF-κB 信号通路的过度激活）可能抑制 TREM2 介导的抗炎通路。此外，在强烈的炎症或应激条件下，细胞表面受体的表达水平不仅受其转录和翻译调控，还可能受到蛋白水解脱落或内化降解的影响。例如，炎症微环境中活化的基质金属蛋白酶（MMPs）可切割 TREM2 的胞外结构域，导致可溶性 TREM2（sTREM2）释放，并降低膜结合型 TREM2（mTREM2）的表达水平[52]。因此，高浓度 CSE 诱导的强烈炎症反应可能通过促进 TREM2 的蛋白水解脱落，进一步降低其功能性表达。然后我们进一步研究发现敲减 TREM2 的表达能够有效抑制 CSE 诱导的 MH-S 细胞死亡。然而这一发现与一部分研究存在差异：在动脉粥样硬化或肿瘤模型中，TREM2 通常通过促进细胞存活或抑制铁死亡发挥保护作用[53]，也有研究表明，TREM2 缺陷通过 JAK-STAT 通路促进巨噬细胞凋亡和极化，从而加重肾损伤[54]。但在本研究的香烟烟雾刺激下，TREM2 却呈现出“促死亡”特性。这种矛盾的生物学效应可能源于 TREM2 信号通路的组织特异性或疾病背景依赖性[55]，从而可能形成环境依赖性调控的可能。我们的研究结果表明，TREM2 可以调控香烟烟雾诱导的小鼠肺巨噬细胞的坏死性凋亡进而影响炎症反应。总之，我们的确发现了 TREM2 参与了香烟诱导的巨噬细胞坏死性凋亡的过程，但是 TREM2 如何影响巨噬细胞的死亡并且具体机制还需要进一步探索。

我们的研究结果还表明，吸烟小鼠的肺中炎症因子（包括 TNF-α、IL-1β 和 IL-10）的表达增高。这些细胞因子是香烟烟雾引起的慢性炎症和组织损伤发展的关键因素。TNF-α 和 IL-1β 的增加表明肺内存在强烈的炎症反应，这与香烟烟雾对巨噬细胞活化的已知影响一致。在吸烟引发的肺部疾病中，促炎因子与抗炎因子的动态平衡对疾病转归具有决定性作用[56]。促炎因子如 TNF-α 和 IL-1β 可通过激活 NF-κB 信号通路放大炎症反应，促进中性粒细胞浸润及蛋白酶释放，最终导致肺实质破坏[57]。而抗炎因子 IL-10 则通过抑制促炎介质合成、增强调节性 T 细胞功能等机制维持免疫稳态[58]。这种精细的细胞因子网络调控失衡被认为是吸烟相关肺疾病发生发展的核心机制。有趣的是，抗炎细胞因子 IL-10 在吸烟小鼠的肺部也有所升高，这种升高可能反映了肺巨噬细胞在烟雾刺激下发生了一种适应性或代偿性的 M2 样极化，试图通过产生 IL-10 来减轻烟雾引起的炎症损伤从而平衡促炎环境的一种尝试

中国知网 https://www.cnki.net

[59]。IL-10 升高可能是旨在部分解决炎症和促进组织修复的反馈机制。另外，我们也发现敲低 TREM2 导致 IL-1β 和 IL-10 的表达显著降低。这些发现表明，TREM2 在调节香烟烟雾暴露后这些细胞因子的表达方面发挥着作用。TREM2 的激活通常与抗炎反应和 M2 巨噬细胞极化相关。例如，在某些模型中，TREM2 信号可以促进巨噬细胞向 M2 表型转化[60]。TREM2 敲低后 IL-1β 和 IL-10 表达的减少表明 TREM2 可能参与激活促炎通路和促进抗炎反应。TREM2 敲低后 IL-10 表达的减少也很明显。暴露于烟雾的肺部中 IL-10 水平升高可能代表免疫系统试图平衡高度炎症状态。然而，这种补偿反应可能不足以解决持续的炎症，从而导致慢性炎症环境。TREM2 敲低从而降低 IL-10 表达这一事实表明 TREM2 可能导致整体免疫反应失调，而不是严格发挥促炎或抗炎的作用[61]。然而，值得注意的是，TREM2 敲低后 TNF-α 的表达没有发生显著变化。这可能是因为 TNF-α 可能通过独立于 TREM2 的途径进行调节，或者可能存在补偿机制，尽管 TREM2 水平降低，但仍能维持 TNF-α 的表达。TREM2 敲低后 TNF-α 表达没有发生显著变化也可能反映了细胞因子调节的复杂性，其中多种信号通路可能汇聚在一起调节炎症介质的产生。

另外，与已有报道不同，我们的实验结果并没有观察到 HIF-1α 抑制剂的作用对 RIPK3 的影响[62]，但却发现 HIF-1α 抑制剂能够激活 RIPK3 的磷酸化，并且我们还观察到 HIF-1α 抑制不仅可以增加磷酸化 MLKL 的蛋白表达量还可以上调 MLKL 总蛋白的含量，这些结果表明 HIF-1α 对坏死性凋亡核心蛋白的调控不仅是通过磷酸化坏死性凋亡经典途径蛋白 RIPK3/MLKL 发挥作用而且还能直接调节 MLKL 的总蛋白表达水平来影响坏死性凋亡的发生。

总之，我们的研究为 TREM2 调节香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞炎症反应和坏死性凋亡的机制提供了新的见解。TREM2 通过下调 HIF-1α 进而促进坏死性凋亡途径的激活这一作用机制突出了 TREM2 可能是调节吸烟相关疾病炎症反应的潜在治疗靶点。所以我们仍需要进一步研究如何利用 TREM2 信号传导的调节来减少肺巨噬细胞的坏死性凋亡从而减轻肺部的炎症反应，从而提供一种预防或改善慢阻肺等慢性炎症疾病进展的策略。

当前研究存在以下局限：未明确 TREM2 调控 HIF-1α 的具体分子机制（如是否通过蛋白酶体降解途径）；使用永生化细胞系可能影响生理相关性。除通过调控 HIF-1α/RIPK3/MLKL 信号通路外，TREM2 还可能通过其他机制在肺巨噬细胞坏死性凋亡及炎症反应中发挥作用，后续仍需进一步研究以明确 TREM2 在肺巨噬细胞

中国知网 https://www.cnki.net

坏死性凋亡及炎症反应中的具体作用。尽管如此，本研究首次揭示 TREM2-HIF-1α-RIPK3-MLKL 调控轴，为开发靶向坏死性凋亡的慢阻肺治疗策略提供了理论依据。未来的研究还可以对以下方面进行探索：TREM2 激动剂对肺巨噬细胞存活的影响；HIF-1α 在香烟烟雾诱导的坏死性凋亡中的特异性作用等。

中国知网 https://www.cnki.net

5 结 论

1. 香烟烟雾诱导了肺巨噬细胞的坏死性凋亡和炎症反应。

2. TREM2能够通过HIF-1α/RIPK3/MLKL信号通路调控香烟烟雾诱导的小鼠肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应。

中国知网 https://www.cnki.net

本研究创新性的自我评价

1. 目前尚无 TREM2 调控香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡的相关报道；

2. 本研究首次发现 TREM2 能够通过调控 HIF-1α/RIPK3/MLKL 信号通路影响香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞坏死性凋亡和炎症反应。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Vineis P, Airoldi L, Veglia F, *et.al*. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study[J]. BMJ (Clinical research ed.), 2005, 330(7486): 277.

[2] Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, *et.al*. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(5): 1033.

[3] WHO. Tobacco[R]. WHO, 2023.

[4] Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre G E, *et.al*. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 813: 152667.

[5] Caliri A W, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer[J]. Mutation Research. Reviews in Mutation Research, 2021, 787: 108365.

[6] Kearley J, Silver J S, Sanden C, *et.al*. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection[J]. Immunity, 2015, 42(3): 566-579.

[7] Oh C K, Murray L A, Molfino N A. Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Pulmonary Medicine, 2012, 2012: 808260.

[8] Lugg S T, Scott A, Parekh D, *et.al*. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease[J]. Thorax, 2022, 77(1): 94-101.

[9] Zhang F, Cui Y, Zhang T, *et.al*. Epigenetic regulation of macrophage activation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1445372.

[10] Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, *et.al*. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(5): 1033.

[11] Xiao J, Hou F, Wang H, *et.al*. Monocyte-Derived Macrophages Induce Alveolar Macrophages Death via TNF-α in Acute Lung Injury[J]. Immunity, Inflammation and Disease, 2024, 12(12): e70081.

中国知网 https://www.cnki.net

[12] Lugg S T, Scott A, Parekh D, *et.al*. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease[J]. Thorax, 2022, 77(1): 94-101.

[13] Tian X, Xie G, Xiao H, *et.al*. CXCR4 knockdown prevents inflammatory cytokine expression in macrophages by suppressing activation of MAPK and NF-κB signaling pathways[J]. Cell & Bioscience, 2019, 9: 55.

[14] Lee J W, Chun W, Lee H J, *et.al*. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases[J]. Cells, 2021, 10(4): 897.

[15] Pouwels S D, Zijlstra G J, Van der Toorn M, *et.al*. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice[J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2016, 310(4): L377-386.

[16] Bedoui S, Herold M J, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2020, 21(11): 678-695.

[17] Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 435.

[18] Zhu Z, Lian X, Su X, *et.al*. Exosomes derived from adipose-derived stem cells alleviate cigarette smoke-induced lung inflammation and injury by inhibiting alveolar macrophages pyroptosis[J]. Respiratory Research, 2022, 23(1): 5.

[19] Pandey K C, De S, Mishra P K. Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 512.

[20] Park E J, Lee H S, Lee S J, *et.al*. Cigarette smoke condensate may disturb immune function with apoptotic cell death by impairing function of organelles in alveolar macrophages[J]. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA, 2018, 52: 351-364.

[21] Aoshiba K, Tamaoki J, Nagai A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages[J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001, 281(6): L1392-1401.

[22] Kearney C J, Martin S J. An Inflammatory Perspective on Necroptosis[J]. Molecular Cell, 2017, 65(6): 965-973.

[23] Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview[J]. Cell Death and Differentiation, 2017, 24(7): 1184-1195.

中国知网 https://www.cnki.net

[24] Guo Y, Zhou J, Wang Y, *et.al*. Cell type-specific molecular mechanisms and implications of necroptosis in inflammatory respiratory diseases[J]. Immunological Reviews, 2024, 321(1): 52-70.

[25] Lin L, Li J, Song Q, *et.al*. The role of HMGB1/RAGE/TLR4 signaling pathways in cigarette smoke-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Immunity, Inflammation and Disease, 2022, 10(11): e711.

[26] Mei X, Zhang Y, Wang S, *et.al*. Necroptosis in Pneumonia: Therapeutic Strategies and Future Perspectives[J]. Viruses, 2024, 16(1): 94.

[27] Bharadwaj S, Groza Y, Mierzwicka J M, *et.al*. Current understanding on trem-2 molecular biology and physiopathological functions[J]. International Immunopharmacology, 2024, 134: 112042.

[28] Gu X, Kang H, Cao S, *et.al*. Blockade of TREM2 ameliorates pulmonary inflammation and fibrosis by modulating sphingolipid metabolism[J]. Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2025, 275: 1-17.

[29] Upadhyay A A, Viox E G, Hoang T N, *et.al*. TREM2+ and interstitial-like macrophages orchestrate airway inflammation in SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 1914.

[30] Luo Q, Deng D, Li Y, *et.al*. TREM2 Insufficiency Protects against Pulmonary Fibrosis by Inhibiting M2 Macrophage Polarization[J]. International Immunopharmacology, 2023, 118: 110070.

[31] Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics[J]. BMJ (Clinical research ed.), 2002, 324(7344): 1018-1022.

[32] Corcoran S E, O'Neill L A J. HIF1α and metabolic reprogramming in inflammation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2016, 126(10): 3699-3707.

[33] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen B E, *et.al*. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation[J]. Cell, 2003, 112(5): 645-657.

[34] Karshovska E, Wei Y, Subramanian P, *et.al*. HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α) Promotes Macrophage Necroptosis by Regulating miR-210 and miR-383[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2020, 40(3): 583-596.

[35] Zhang T, Chen L, Kueth G, *et.al*. Lactate's impact on immune cells in sepsis: unraveling the complex interplay[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1483400.

中国知网 https://www.cnki.net

[36] Lyu P, Wen J, Zhang W, *et.al*. Expression of HIF1α in intestinal epithelium restricts arthritis inflammation by inhibiting RIPK3-induced cell death machinery[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2024, 83(8): 984-997.

[37] Wang Y, Liu H H, Cao Y T, *et.al*. The Role of Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Carcinogenesis, Metastasis and Therapy[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 413.

[38] Liu S, Joshi K, Denning M F, *et.al*. RIPK3 signaling and its role in the pathogenesis of cancers[J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2021, 78(23): 7199-7217.

[39] Yang X S, Yi T L, Zhang S, *et.al*. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5818.

[40] Santoro A, Tomino C, Prinzi G, *et.al*. Tobacco Smoking: Risk to Develop Addiction, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Lung Cancer[J]. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2019, 14(1): 39-52.

[41] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2009, 6(2): 445-462.

[42] Karavitis J, Kovacs E J. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2011, 90(6): 1065-1078.

[43] Hackett T L, Holloway R, Holgate S T, *et.al*. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study[J]. Respiratory Research, 2008, 9(1): 47.

[44] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. Nature, 2015, 517(7534): 311-320.

[45] Royce G H, Brown-Borg H M, Deepa S S. The potential role of necroptosis in inflammaging and aging[J]. GeroScience, 2019, 41(6): 795-811.

[46] Lu Z, Van Eeckhoutte H P, Liu G, *et.al*. Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2021, 204(6): 667-681.

中国知网 https://www.cnki.net

[47] Kober D L, Brett T J. TREM2-Ligand Interactions in Health and Disease[J]. Journal of Molecular Biology, 2017, 429(11): 1607-1629.

[48] Chen S, Peng J, Sherchan P, *et.al*. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. Journal of Neuroinflammation, 2020, 17(1): 168.

[49] Li L, Chen Q, Qin Y, *et.al*. Regulation of TREM2 on BV2 inflammation through PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2024, 40(4): 4040-4061.

[50] Liu W, Taso O, Wang R, *et.al*. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions[J]. Human Molecular Genetics, 2020, 29(19): 3224-3248.

[51] Hussell T, Bell T J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context[J]. Nature Reviews. Immunology, 2014, 14(2): 81-93.

[52] Zhong L, Chen X F, Wang T, *et.al*. Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2017, 214(3): 597-607.

[53] Peng X, Sun B, Tang C, *et.al*. HMOX1-LDHB interaction promotes ferroptosis by inducing mitochondrial dysfunction in foamy macrophages during advanced atherosclerosis[J]. Developmental Cell, 2024: S1534-5807(24)00733-0.

[54] Cui Y, Chen C, Tang Z, *et.al*. TREM2 deficiency aggravates renal injury by promoting macrophage apoptosis and polarization via the JAK-STAT pathway in mice[J]. Cell Death & Disease, 2024, 15(6): 401.

[55] Liu W, Taso O, Wang R, *et.al*. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions[J]. Human Molecular Genetics, 2020, 29(19): 3224-3248.

[56] Gonçalves R B, Coletta R D, Silvério K G, *et.al*. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms[J]. Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society, 2011, 60(5): 409-424.

[57] 叶慧.TREM2 通过巨噬细胞来源外泌体抑制脓毒症休克肾上腺皮质酮水平及其机制研究[J]. 博士学位论文, 2023.

[58] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells[J]. Nature Reviews. Immunology, 2010, 10(3): 170-181.

中国知网 https://www.cnki.net

[59] Koncz G, Jenei V, Tóth M, *et.al*. Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1169560.

[60] Luo Q, Deng D, Li Y, *et.al*. TREM2 Insufficiency Protects against Pulmonary Fibrosis by Inhibiting M2 Macrophage Polarization[J]. International Immunopharmacology, 2023, 118: 11007.

[61] Liu W, Taso O, Wang R, *et.al*. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions[J]. Human Molecular Genetics, 2020, 29(19): 3224-3248.

[62] Lyu P, Wen J, Zhang W, *et.al*. Expression of HIF1α in intestinal epithelium restricts arthritis inflammation by inhibiting RIPK3-induced cell death machinery[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2024, 83(8): 984-997.

中国知网 https://www.cnki.net

综 述

巨噬细胞程序性死亡在吸烟相关肺部疾病中的作用机制

摘要：目前，吸烟仍然是呼吸系统疾病主要的并且可预防的危险因素，其在慢性阻塞性肺病 (慢阻肺)、肺癌和其他肺部病变中的危害早已得到了充分证实。吸烟相关肺损伤的发病机制核心是免疫细胞功能特别是肺巨噬细胞功能的破坏。这些免疫细胞在肺稳态中起着关键作用，协调清除肺部病原体、凋亡细胞和各种组织坏死碎片。然而，接触香烟烟雾中的有毒成分——包括活性氧 (ROS)、颗粒物和致癌物也会改变巨噬细胞的功能，导致巨噬细胞的功能障碍甚至死亡。暴露于香烟烟雾的巨噬细胞对程序性细胞死亡途径的敏感性增加，包括细胞凋亡、坏死、细胞焦亡和坏死性凋亡。死亡的类型和方式因烟雾暴露的强度和持续时间而异，导致不同的免疫后果。虽然在某些情况下，细胞凋亡可能有助于消退炎症，但坏死途径（尤其是细胞焦亡和坏死性凋亡）则会触发促炎介质的释放，从而加剧局部组织损伤。此外，通常伴随烟雾引起的损伤的细胞凋亡受损会加剧组织病理反应，导致凋亡细胞积聚，最终发生继发性坏死，进一步加剧炎症反应。肺部暴露于香烟烟雾后，巨噬细胞清除机制的这种破坏会形成炎症—细胞死亡—组织损伤循环从而导致疾病进展。研究香烟烟雾诱导巨噬细胞死亡的具体分子途径对于了解在吸烟者中观察到的慢性炎症和免疫功能受损至关重要。在这篇综述中，我们将探讨香烟烟雾诱导巨噬细胞死亡的机制基础、其对肺部炎症和组织损伤的影响，以及旨在调节吸烟相关肺部疾病中巨噬细胞存活和功能的潜在治疗目标。

关键词：香烟烟雾 巨噬细胞 慢阻肺 巨噬细胞 细胞死亡

1. 背景

香烟烟雾是导致慢性呼吸系统疾病的首要可预防风险因素。据世界卫生组织统计，每年因主动吸烟和二手烟暴露导致的死亡人数超过 800 万[1]。香烟烟雾中含有 7,000 余种化学物质，其中活性氧、丙烯醛等成分可通过诱导氧化应激、破坏线粒体功能及激活炎症信号通路等方式介导肺损伤[2]。流行病学研究显示，长期香烟烟雾暴露与慢阻肺、肺气肿和肺癌的发生发展密切相关[3]，其核心机制涉及氧化应激

中国知网 https://www.cnki.net

介导的蛋白酶-抗蛋白酶失衡及持续性炎症反应[4]。值得注意的是，香烟烟雾的病理效应不仅局限于气道上皮细胞，还可通过直接毒性作用和微环境重塑影响肺巨噬细胞[5]。

肺巨噬细胞可分为肺泡巨噬细胞和间质巨噬细胞，它们通过吞噬病原体、清除凋亡细胞及分泌抗炎因子维持组织稳态[6]。然而香烟烟雾暴露会显著改变其功能特性：临床研究表明吸烟者肺泡巨噬细胞的吞噬能力下降，,胞吐作用减少，促炎因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的分泌量增加[7]。这种功能异常与香烟烟雾诱导的表观遗传重编程相关[8]，香烟烟雾诱导的线粒体 ROS 累积和 ER 应激可协同激活 NLRP3 炎症小体，使巨噬细胞对焦亡和坏死性凋亡等炎性程序性死亡途径的敏感性增加，形成 cGAS-STING 通路介导的自我延续性炎症循环[9]。暴露于香烟烟雾的巨噬细胞中的细胞死亡是一个多方面的过程，涉及多种调节途径，包括细胞凋亡、坏死、细胞焦亡和坏死性凋亡[10]，这些死亡方式能够导致慢性疾病（如慢阻肺）的炎症反应。细胞凋亡或程序性细胞死亡通常是一种受控的非炎症过程，通过消除受损或功能失调的细胞在维持免疫稳态方面发挥着至关重要的作用[11]。另外，在香烟烟雾暴露条件下，肺巨噬细胞不仅发生程序性凋亡，其胞葬作用关键功能也显著受损[12]。这种清除能力缺陷导致凋亡小体异常积聚，随着时间推移，未被及时清除的凋亡细胞会进入继发性坏死阶段[13]。该病理过程伴随损伤相关分子模式（DAMPs）的释放，包括高迁移率族蛋白 1（HMGB1）和细胞内核苷酸（如 ATP）等内源性危险信号[13]。值得注意的是，HMGB1 可通过晚期糖基化终产物受体和 Toll 样受体等模式识别受体激活下游信号[14]，而 ATP 则作为配体激活嘌呤能受体 P2X7[15]。这些受体的活化最终导致 NF-κB 和 MAPK 等促炎信号通路激活，驱动 IL-1β、TNF-α 等炎性细胞因子大量释放，形成持续放大的炎症级联反应[16]。除了细胞凋亡之外，香烟烟雾还会激活炎性胱天蛋白酶，特别是胱天蛋白酶-1，从而引发细胞焦亡过程[17]。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡，其特征是膜孔的形成和 IL-1β、IL-18 的释放，这两种强效促炎性细胞因子有助于肺部的炎症反应[18]。此外，坏死性凋亡作为重要的促炎性程序性死亡方式已被广泛关注。该途径的经典激活机制涉及受体相互作用蛋白激酶 RIPK1 和 RIPK3 的磷酸化级联反应，二者通过 RHIM 结构域形成坏死小体复合物。此复合物进一步磷酸化混合谱系激酶结构域样蛋白（MLKL），导致 MLKL 寡聚化并转位至细胞膜形成孔道，最终引发膜完整性丧失和损伤相关分子模式（DAMPs）的释放[19] [20]。值得注意的是，当凋亡关键效应分子 Caspase-8 活性被抑制时，细胞

中国知网 https://www.cnki.net

死亡模式会从凋亡向坏死性凋亡转换[21]，这种"分子开关"机制使坏死性凋亡成为促炎微环境形成的重要推手。研究表明，香烟烟雾暴露可同时激活巨噬细胞的凋亡、坏死、焦亡和坏死性凋亡通路，这些死亡途径通过共享分子元件（如 Caspase 家族蛋白、gasdermin 蛋白家族）形成调控网络[22] [23]，其动态平衡直接影响组织炎症程度。阐明这些交叉对话机制对于开发靶向调控细胞死亡、阻断慢性炎症恶性循环的干预策略具有重要价值，特别是对慢阻肺等吸烟相关疾病的治疗具有转化医学意义。

鉴于香烟烟雾、巨噬细胞功能障碍和细胞死亡途径之间的复杂相互作用，了解驱动这些过程的精确分子机制对于开发新的治疗策略至关重要。在这篇综述中，我们将探讨香烟烟雾如何影响肺巨噬细胞死亡的调节、对慢性肺部疾病的影响，以及旨在调节吸烟相关肺部病变中巨噬细胞存活和功能的潜在治疗干预措施。

2. .暴露于烟雾的肺中巨噬细胞死亡的机制

2.1 细胞凋亡

香烟烟雾通过多重分子机制诱导肺巨噬细胞凋亡，其中 ROS 生成、线粒体功能障碍和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（caspase）级联激活构成核心调控网络[24]。这些过程不仅直接导致巨噬细胞死亡，还会加剧肺组织损伤并维持慢性炎症微环境，最终促进慢阻肺等吸烟相关疾病的进展。ROS 过度生成是香烟烟雾诱导凋亡的始动因素[25]。作为高反应性代谢产物，ROS 通过以下途径发挥双重破坏作用：一是可以直接损伤生物大分子：攻击细胞膜脂质引发脂质过氧化、修饰关键功能蛋白、造成 DNA 氧化损伤[26]；二是能够破坏氧化还原稳态，香烟烟雾显著消耗谷胱甘肽等内源性抗氧化物质，导致细胞清除 ROS 能力下降，形成恶性循环[27]；另外 ROS 还可以通过激活促炎信号通路，例如，NF-κB 通路上调 TNF-α、IL-6 等促炎因子表达，建立慢性炎症的正反馈环路[28]。线粒体作为细胞内氧化还原稳态和程序性死亡调控的核心枢纽，在香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞凋亡中发挥双重作用[29]。研究显示，香烟烟雾暴露可诱导线粒体膜电位去极化并开放通透性转换孔，导致促凋亡蛋白细胞色素 C 向胞质释放[30]。值得注意的是，线粒体源性的 ROS 不仅是内源性凋亡的触发因子，还能通过激活 JNK/p38 MAPK 等应激信号通路形成正反馈环路，协同放大凋亡信号[31] [32]。这种线粒体依赖性凋亡通路与死亡受体介导的外源性通路（如 Fas/FasL 系统）存在交叉对话，二者通过 Bid 蛋白剪切形成分子层面的信号整合，共同构成香烟烟雾诱导巨噬细胞程序性死亡的调控网络[33]。

从代谢调控视角来看，线粒体功能障碍对巨噬细胞凋亡具有双重推动作用。香

中国知网 https://www.cnki.net

烟烟雾暴露不仅破坏电子传递链导致 ATP 合成受阻，还会通过诱导线粒体自噬异常影响能量代谢重编程[24]，这种能量危机直接削弱细胞的吞噬清除能力，同时通过 AMPK/mTOR 通路改变代谢检查点，促使细胞进入凋亡程序[34]。值得关注的是，肺巨噬细胞特有的线粒体表型可能加剧其香烟烟雾敏感性——相较于循环单核细胞，肺泡驻留巨噬细胞更依赖氧化磷酸化供能，这种代谢特性使其对线粒体损伤尤为脆弱[35]。

除线粒体介导的内源性凋亡途径外，研究证实香烟烟雾还可通过死亡受体途径激活肺巨噬细胞的外源性凋亡。该途径的启动依赖于肺巨噬细胞表面高表达的 Fas 受体[36]，当香烟烟雾中活性氧成分诱导肺泡上皮细胞释放 Fas 配体（FasL）后，FasL−Fas 受体复合物通过衔接蛋白 FADD 募集 procaspase−8 形成死亡诱导信号复合物[37]。香烟烟雾暴露可同时上调肺巨噬细胞 TNFR1、TRAIL−R 等死亡受体表达[38]，提示外源性凋亡途径在该特定细胞类型中具有多重激活节点。这种受体介导的凋亡机制与线粒体途径形成互补，共同解释临床观察到的慢阻肺患者肺泡灌洗液中巨噬细胞异常凋亡现象。

总之，香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞凋亡是一个由多种分子途径驱动的高度复杂的过程，包括氧化应激、线粒体功能障碍和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶激活。这些事件不仅导致巨噬细胞死亡，而且持续炎症循环，导致组织损伤和慢性肺部疾病的发生。了解这些分子机制有助于深入了解吸烟相关疾病的病理生理学，并可指导开发靶向治疗策略，旨在调节细胞死亡途径，以减少炎症和改善患者的肺功能。

2.2 巨噬细胞的坏死和继发性坏死

虽然细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种受控形式，但坏死和继发性坏死是更加混乱和炎症的过程，这进一步加剧了吸烟者肺部的组织损伤[39]。暴露于香烟烟雾的肺巨噬细胞坏死代表正常细胞死亡过程的失败，并导致细胞内内容物不受控制地释放，从而加剧炎症并损害周围组织[40]。在暴露于烟雾的巨噬细胞中，坏死可能由有毒化合物的持续攻击引发，包括 ROS 和香烟烟雾中存在的其他自由基[41]。当巨噬细胞发生坏死时，其质膜的结构完整性会丧失，导致细胞内容物，例如蛋白水解酶和损伤相关分子模式 (DAMP)释放到细胞外空间。这些细胞内成分的释放会激活邻近的免疫细胞，从而加剧局部炎症反应[25]。这种不受控制的炎症活动会导致慢阻肺和肺气肿等疾病的进展。继发性坏死是细胞清除功能缺陷的直接后果，细胞清除是凋亡细胞被巨噬细胞和其他吞噬细胞清除的过程[42]。在健康的肺部，凋亡细胞在坏

中国知网 https://www.cnki.net

死之前会被迅速清除，从而防止促炎细胞内容物的释放。然而，香烟烟雾暴露会损害肺巨噬细胞的细胞清除能力[43]。吞噬功能的这种损害会导致凋亡巨噬细胞的积累，如果不及时清除，最终会转变为继发性坏死[44]。继发性坏死的特征是凋亡细胞膜完整性丧失，导致细胞内成分不受控制地释放，与原发性坏死非常相似[45]。继发性坏死巨噬细胞释放的 DAMP（包括线粒体 DNA、细胞溶质蛋白和 ROS）会加剧肺微环境中的炎症，进一步导致组织损伤[46]。

2.3 巨噬细胞中的细胞焦亡

细胞焦亡是一种高度炎症形式的受控细胞死亡，由病原体相关分子模式 (PAMP) 和损伤相关分子模式 (DAMP) 触发[47]。在接触香烟烟雾的个体的肺部，细胞焦亡会显著增加促炎环境，加剧组织损伤和慢阻肺等疾病的进展。这种形式的细胞死亡主要由 caspase-1 的激活介导，从而触发 gasdermin D (GSDMD) 的裂解，最终导致质膜上形成孔隙并释放 IL-1β 和 IL-18 等炎症因子[48]。香烟烟雾中的 ROS 和颗粒物会导致线粒体功能障碍和细胞损伤，从而激活炎症小体并引发细胞焦亡的多分子复合物[49]。在这种情况下，特征最明显的炎症小体是 NLRP3，它可以感知香烟烟雾诱导的 ROS 和其他细胞应激信号[50]。一旦被激活，NLRP3 炎症小体就会将 pro-caspase-1 裂解为活性形式 caspase-1。然后，caspase-1 将 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 加工成成熟的分泌形式[51]。caspase-1 的激活还会导致 gasdermin D (GSDMD) 裂解，从而在质膜上形成孔隙，导致这些细胞因子的释放，并导致巨噬细胞焦亡[52]。通过 GSDMD 孔道释放 IL-1β 和 IL-18，驱动自分泌和旁分泌炎症循环，吸引更多免疫细胞进入肺部并延续炎症循环[53]。这种释放会加剧局部炎症，进一步加剧香烟烟雾造成的肺组织损伤。这种持续的炎症反应在 慢阻肺、肺气肿和其他烟雾诱发的肺部病变的发展和进展中起着重要作用。在接触香烟烟雾的情况下，细胞焦亡会加剧肺部的慢性炎症环境，导致持续的组织损伤和重塑[54]。巨噬细胞中炎症小体的持续激活和细胞焦亡不仅会导致炎症介质的释放，还会削弱肺部消炎和修复组织的能力。这种无法消炎的情况会导致持续的组织破坏，这是 慢阻肺 等疾病的标志。此外，细胞焦亡还会损害巨噬细胞功能，降低其清除病原体和凋亡细胞的能力[55]，从而进一步促进疾病进展。抑制细胞焦亡或调节炎症小体通路可能是一种潜在的治疗策略，可以减轻慢性炎症并防止接触香烟烟雾的患者进一步受到肺部损伤。

2.4 巨噬细胞中的坏死性凋亡

中国知网 https://www.cnki.net

坏死性凋亡是一种受调控的坏死性细胞死亡形式，具有细胞凋亡和坏死的特征，会导致香烟烟雾暴露的肺部出现炎症和组织损伤[56]。与非炎症性的细胞凋亡不同，坏死性凋亡是一种高度炎症性的细胞死亡形式，由受体相互作用蛋白激酶 1 和 3 (RIPK1 和 RIPK3) 的激活引起[57]。该过程对于慢性炎症性肺部疾病（如慢阻肺、肺气肿和肺纤维化）的进展至关重要。TNF-α 是一种细胞因子，其水平在吸烟者的肺部显著升高。当细胞表面受体被促炎配体（如 TNF-α）激活时，就会引发坏死性凋亡。受体激活后，RIPK1 和 RIPK3 相互作用形成坏死体，然后触发下游信号事件，导致坏死性细胞死亡。香烟烟雾通过其氧化应激和炎症作用激活 TNF 信号通路，导致肺巨噬细胞中 RIPK1 和 RIPK3 的募集和激活。在暴露于烟雾的肺中，TNF-α 的过度激活和随后的坏死性凋亡不仅会导致细胞死亡，还会导致释放促炎分子，从而增强局部免疫反应[58]。这种坏死性凋亡和炎症的自我延续循环是吸烟者中观察到的慢性肺损伤的重要原因。当 RIPK3 被激活，它就会磷酸化 MLKL，磷酸化的 MLKL 易位到质膜，在膜上形成孔隙，导致膜完整性丧失，最终导致细胞裂解。细胞内内容物的释放(DAMP)，进一步加剧了肺部的炎症反应[59]。在香烟烟雾暴露的背景下，MLKL 介导的巨噬细胞坏死性凋亡对香烟烟雾介导的肺部疾病尤为重要。死亡的巨噬细胞会释放大量促炎介质和 DAMP，包括线粒体 DNA 和 HMGB1，它们会将额外的免疫细胞募集到受伤部位。这造成了细胞死亡和炎症的恶性循环，导致肺损伤和纤维化持续存在[60]。坏死性凋亡在吸烟相关肺部疾病发病机制中的作用正日益得到认可。在慢性吸烟者的肺部，坏死性凋亡会引发持续的炎症反应，而这种炎症反应是 慢阻肺 和肺气肿发展的基础[61]。当巨噬细胞发生坏死性凋亡时，清除病原体和凋亡细胞的功能受损，从而导致慢性炎症无法解决。坏死性凋亡的慢性性质还会导致肺部组织重塑和纤维化[62]。反复的坏死性细胞死亡和 DAMP 释放循环会促进成纤维细胞活化和细胞外基质沉积，导致肺组织瘢痕形成和肺功能不可逆下降，这是 慢阻肺 和肺纤维化等疾病的特征。针对暴露于烟雾的巨噬细胞中的坏死性凋亡为减轻慢性炎症和肺损伤提供了潜在的治疗途径。有研究证实 RIPK1 抑制剂可以阻断坏死性凋亡途径并减少炎症[63]。同样，旨在抑制 MLKL 活化的策略可以防止膜孔形成和促炎细胞内内容物的释放，从而抑制炎症级联。鉴于坏死性凋亡在吸烟者中传播炎症和肺损伤方面发挥着重要作用，抑制该途径的治疗干预措施可能在减缓吸烟相关肺部疾病的进展方面具有巨大潜力。

3. 巨噬细胞死亡和肺部疾病进展

中国知网 https://www.cnki.net

3.1 慢性阻塞性肺疾病

慢阻肺 是一种渐进性、使人衰弱的肺部疾病，其特征是持续的气流受限、慢性炎症和组织破坏，主要影响肺和气道[64]。吸烟是 慢阻肺 发展的最重要风险因素，也是造成该疾病的慢性炎症和肺损伤的主要因素[65]。免疫细胞对于维持肺部稳态至关重要，其中巨噬细胞功能障碍和死亡在 慢阻肺 进展中起着核心作用。香烟烟雾暴露能够导致肺巨噬细胞功能缺陷，一方面通过诱导氧化应激激活 NF-κB 等信号通路，促使 TNF-α、IL-1β 等促炎因子过量分泌，导致慢性炎症环境、组织修复无效和疾病进展[7]。另一方面削弱其胞吞作用，导致凋亡细胞清除障碍[66]。这种双重缺陷形成了"炎症-损伤-持续炎症"的恶性循环。死亡的巨噬细胞会释放损伤相关分子模式 (DAMP)、促炎细胞因子和其他介质，从而增强免疫细胞的募集和激活[67]。烟草烟雾引发的氧化应激是触发炎症反应的关键因素[68]。氧化应激激活了如核因子 κB（NF-κB）等重要的炎症信号通路，导致促炎细胞因子的分泌，如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6[69]。这些细胞因子不仅吸引更多免疫细胞进入肺部，还持续激活巨噬细胞，维持慢性炎症环境，这直接导致小气道阻塞和肺组织破坏（如肺气肿）。慢阻肺 中凋亡巨噬细胞清除缺陷会导致继发性坏死，从而加剧组织损伤和炎症[70]。从而导致肺泡的破坏（肺气肿）和小气道阻塞。在 慢阻肺 中，坏死性凋亡也会导致细胞内成分和 DAMP 的释放，从而进一步推动炎症和免疫细胞募集[71]。这一过程会进一步导致气道壁增厚、粘液分泌过多和纤维化。香烟暴露引发的肺巨噬细胞焦亡通过激活 NLRP3 炎症小体途径，导致大量 IL-1β 和 IL-18 等促炎因子释放，形成自我放大的炎症循环。这种持续性炎症微环境不仅促进中性粒细胞浸润和蛋白酶/抗蛋白酶失衡，还与肺泡巨噬细胞线粒体功能障碍协同作用，共同驱动慢阻肺特征性的气道重塑及肺气肿形成[72]。值得注意的是，巨噬细胞死亡模式的选择性调控存在表型依赖性——M1 型倾向于发生焦亡并加剧炎症，而 M2 型则更易出现胞葬功能缺陷导致的次级坏死[70]。针对这种细胞死亡异质性，当前治疗策略聚焦于三个层面：通过 PPARγ 激动剂等调节巨噬细胞极化平衡，利用 Nrf2 激活剂缓解氧化应激诱导的死亡信号，以及开发特异性抑制 gasdermin D 孔道形成的焦亡抑制剂。最新研究还发现，增强 ABCA1 介导的胆固醇逆向转运可显著改善巨噬细胞胞葬能力，这为打破"凋亡细胞积累-持续炎症"恶性循环提供了新方向。

3.2 肺纤维化

中国知网 https://www.cnki.net

肺纤维化是以进行性肺间质瘢痕形成为特征的病理过程，其核心病理改变包括细胞外基质（ECM）异常沉积导致的肺泡结构破坏和肺功能进行性丧失。近年研究表明， 香烟烟雾暴露不仅通过诱发慢性炎症促进 PF 进展，更通过调控肺巨噬细胞死亡模式深刻影响纤维化进程[73]。作为肺组织常驻免疫细胞，巨噬细胞在维持肺泡稳态和损伤修复中发挥核心作用。香烟烟雾暴露会诱导巨噬细胞向促纤维化表型（M2 型）极化，并通过程序性死亡途径释放关键纤维化介质[74]。香烟烟雾刺激通过激活 NLRP3 炎症小体通路，促使 IL-1β 和 IL-18 大量释放，直接激活成纤维细胞转化为肌成纤维细胞[75]。另外，巨噬细胞表面暴露的磷脂酰丝氨酸可促进 TGF-β 信号通路活化，通过 Smad3 磷酸化驱动 ECM 合成[76]。ECM 的积聚会破坏正常的肺结构，导致肺纤维化患者肺功能下降。另外，香烟烟雾诱导的肺巨噬细胞凋亡，在肺纤维化中起着双重作用。在早期阶段，细胞凋亡可以通过清除受损细胞来限制炎症。然而，在长期暴露于烟雾的肺部，凋亡巨噬细胞的清除受损（胞吞作用）导致凋亡小体的积聚，并发生继发性坏死。这种细胞内内容物的释放，包括 DAMP 和促纤维化细胞因子，会加剧肺部的慢性炎症和纤维化环境[77]。此外，TGF-β 是纤维化中的关键细胞因子， TGF-β 促进成纤维细胞分化为肌成纤维细胞，导致过多的胶原沉积，从而导致肺纤维化的特征性瘢痕形成[78]。坏死性凋亡是一种由受体相互作用蛋白激酶 (RIPK1 和 RIPK3) 介导的受控坏死形式，是香烟烟雾暴露肺部肺纤维化的另一个重要因素。在坏死性凋亡中，巨噬细胞释放大量促炎介质和 DAMP，包括 HMGB1 和线粒体 DNA，进一步激活成纤维细胞并刺激 ECM 沉积[59]。研究表明，坏死性凋亡的巨噬细胞可以通过促进炎症和组织重塑的自我延续循环来加剧纤维化。烟雾暴露的肺部坏死性凋亡途径的持续激活会导致慢性炎症环境，有利于成纤维细胞活化和胶原蛋白的产生。这个循环加速了肺纤维化的进展，如果不加以控制，最终会导致呼吸衰竭。针对巨噬细胞死亡途径（如坏死性凋亡和细胞焦亡）为缓解肺纤维化进展提供了潜在的治疗途径。阻断坏死性凋亡的 RIPK1 和 RIPK3 抑制剂可能减少烟雾暴露肺部的炎症和组织重塑。此外，旨在改善胞吐作用的疗法可能有助于解决慢性炎症并减少死亡巨噬细胞释放的促纤维化介质。鉴于巨噬细胞在肺纤维化中驱动炎症和纤维化的核心作用，恢复正常巨噬细胞功能和限制过度细胞死亡的干预措施可能有助于减缓疾病进展并改善患者的预后。

3.3 肺癌

中国知网 https://www.cnki.net

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因，其中香烟烟雾是最重要的风险因素[79]。香烟烟雾含有多种致癌物，包括多环芳烃和亚硝胺，它们直接导致 DNA 突变、细胞应激和肿瘤发生的启动[14]。定居于肺部的巨噬细胞被肿瘤微环境驯化为肿瘤相关巨噬细胞（TAM），其功能特性会随极化状态和微环境信号发生动态改变——既可表现为抗肿瘤的 M1 型，也可分化为促肿瘤的 M2 型表型[80]。值得注意的是，香烟烟雾暴露会通过激活 STAT3 信号通路和抑制 HIF-1α 降解等机制，显著促进巨噬细胞向 M2 型极化偏移[81]。这种病理性的表型转化导致促血管生成因子 VEGF 和免疫抑制因子 TGF-β 的过度分泌，进而加速肿瘤新生血管形成和免疫逃逸进程。更关键的是，研究证实香烟烟雾中苯并芘等致癌物可直接诱导线粒体依赖性凋亡通路，导致肺巨噬细胞在癌前病变阶段过早死亡，这种免疫监视细胞的异常耗竭使 DNA 损伤修复异常的支气管上皮细胞得以逃避免疫清除[82]。凋亡巨噬细胞在肿瘤微环境中的积累会导致促炎细胞因子和生长因子的释放，从而促进肿瘤发生。此外，暴露于烟雾的肺部中受损的胞吐作用会导致凋亡细胞发生继发性坏死，释放损伤相关分子模式，从而形成促肿瘤发生的炎症环境[83]。巨噬细胞凋亡还会削弱免疫系统检测和摧毁肿瘤细胞的能力。通过消耗功能性巨噬细胞的数量，香烟烟雾会削弱肺部的先天免疫防御能力，进一步使癌细胞增殖并形成肿瘤[84]。细胞焦亡是一种炎症形式的细胞死亡，其特征是 GSDMD 介导的膜孔形成，它有助于肺癌中的免疫抑制环境[85]。香烟烟雾激活巨噬细胞中的炎症小体，导致释放促炎细胞因子，如 IL-1β 和 IL-18，这些因子可以支持肿瘤生长和免疫逃避。细胞焦亡巨噬细胞释放的 DAMP 和炎性细胞因子促进血管生成和免疫抑制细胞的募集，如调节性 T 细胞和髓系抑制细胞，它们会抑制抗肿瘤免疫反应。巨噬细胞中细胞焦亡的慢性激活会创造一种持续的炎症环境，支持肿瘤生长，同时抑制免疫系统对癌症有效反应的能力[86]。这种免疫抑制是肺癌肿瘤微环境的标志，使肿瘤能够逃避免疫监视并继续生长。另外，针对巨噬细胞极化和死亡途径是一种很有前途的肺癌治疗方法。通过抑制 M2 样巨噬细胞的促肿瘤发生功能或促进巨噬细胞向 M1 表型重新极化，可能恢复抗肿瘤免疫力并抑制肿瘤生长。此外，旨在阻断坏死性凋亡和细胞焦亡的疗法可以减少促肿瘤炎症并提高免疫系统靶向和消除癌细胞的能力。正在研究新兴疗法，例如免疫检查点抑制剂和巨噬细胞靶向药物，以了解它们调节巨噬细胞活性和改善肺癌患者免疫反应的潜力。

4. 结论

中国知网 https://www.cnki.net

香烟烟雾引起的肺巨噬细胞死亡在慢阻肺、肺纤维化和肺癌等慢性肺部疾病的发展和进展中起着关键作用。本综述强调了香烟烟雾如何引发肺巨噬细胞的多种细胞死亡形式——凋亡、坏死、坏死性凋亡和焦亡，每种形式都对这些疾病的病理过程有独特的贡献。与这些疾病相关的持续性炎症、组织修复受损和重塑源于巨噬细胞的功能障碍和死亡，而巨噬细胞对于维持肺稳态至关重要。吸烟相关疾病中巨噬细胞死亡的辩证性质在于其双重作用。一方面，控制巨噬细胞凋亡可以通过消除受损细胞和解决炎症来发挥作用。然而，当细胞凋亡与受损的胞吞作用相结合时，就会导致继发性坏死从而加剧肺部炎症。同样，虽然程序性坏死（如坏死性凋亡）受到调控，但香烟烟雾刺激也会导致促炎介质的释放，从而维持和恶化慢性炎症。而坏死性凋亡和细胞焦亡在延续这一循环中的作用凸显了香烟烟雾如何从根本上破坏巨噬细胞稳态，导致自我维持的炎症循环，从而推动疾病进展。在肺纤维化中，香烟烟雾诱导的巨噬细胞死亡促进成纤维细胞活化和细胞外基质沉积，导致肺部瘢痕和功能受损。坏死性凋亡和细胞焦亡通过释放激活成纤维细胞并促进胶原沉积的 DAMP 和细胞因子，促进促纤维化环境。针对这些死亡途径为旨在阻止或逆转纤维化进展的治疗干预提供了潜在途径。在肺癌中，肿瘤微环境是由烟雾诱导的巨噬细胞死亡形成的，特别是焦亡和坏死性凋亡，它们促进免疫逃避和肿瘤生长。向促肿瘤发生的 M2 巨噬细胞表型的转变进一步使巨噬细胞与癌症进展之间的相互作用复杂化。了解巨噬细胞死亡如何调节免疫抑制和肿瘤发展，开辟了新的治疗策略，旨在将巨噬细胞重新编程为抗肿瘤状态。从治疗的角度来看，未来的研究可以侧重于选择性调节巨噬细胞死亡途径以恢复肺微环境的平衡。针对细胞死亡的失调机制、增强胞吞作用和重新极化巨噬细胞是缓解吸烟相关肺部疾病中出现的慢性炎症、组织损伤和免疫逃逸的有效策略。

总之，香烟烟雾诱导的巨噬细胞程序性死亡能够促进慢性呼吸系统疾病的进展。所以，开发能够选择性调控这些死亡途径的治疗策略对于治疗慢阻肺、肺纤维化和肺癌等肺部疾病至关重要。未来研究应深入研究维持免疫稳态与抑制过度炎症反应之间的动态平衡机制，从而为开发兼具靶向性和安全性的新型治疗策略提供理论依据。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Durham A L, Adcock I M. The relationship between COPD and lung cancer[J]. Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands), 2015, 90(2): 121-127.

[2] Caliri A W, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2021, 787: 108365.

[3] Szalontai K, Gémes N, Furák J, *et.al*. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers, and Paving the Way to Lung Cancer[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(13): 2889.

[4] Lomas D A. Does Protease-Antiprotease Imbalance Explain Chronic Obstructive Pulmonary Disease?[J]. Annals of the American Thoracic Society, 2016, 13 Suppl 2: S130-137.

[5] Tajbakhsh A, Gheibihayat S M, Mortazavi D, *et.al*. The Effect of Cigarette Smoke Exposure on Efferocytosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease; Molecular Mechanisms and Treatment Opportunities[J]. COPD, 2021, 18(6): 723-736.

[6] Pervizaj-Oruqaj L, Ferrero M R, Matt U, *et.al*. The guardians of pulmonary harmony: alveolar macrophages orchestrating the symphony of lung inflammation and tissue homeostasis[J]. European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society, 2024, 33(172): 230263.

[7] Lugg S T, Scott A, Parekh D, *et.al*. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease[J]. Thorax, 2022, 77(1): 94-101.

[8] Hudlikar R R, Sargsyan D, Cheng D, *et.al*. Tobacco carcinogen 4-[methyl(nitroso)amino]-1-(3-pyridinyl)-1-butanone (NNK) drives metabolic rewiring and epigenetic reprograming in A/J mice lung cancer model and prevention with diallyl sulphide (DAS)[J]. Carcinogenesis, 2022, 43(2): 140-149.

[9] Saaoud F, Shao Y, Cornwell W, *et.al*. Cigarette Smoke Modulates Inflammation and Immunity via Reactive Oxygen Species-Regulated Trained Immunity and Trained Tolerance Mechanisms[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2023, 38(13-15): 1041-1069.

[10] Cristaldi M, Buscetta M, Cimino M, *et.al*. Caspase-8 activation by cigarette smoke induces pro-inflammatory cell death of human macrophages exposed to lipopolysaccharide[J]. Cell Death & Disease, 2023, 14(11): 773.

中国知网 https://www.cnki.net

[11] Mizumura K, Gon Y. Iron-Regulated Reactive Oxygen Species Production and Programmed Cell Death in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2021, 10(10): 1569.

[12] Subramaniam R, Mukherjee S, Chen H, *et.al*. Restoring cigarette smoke-induced impairment of efferocytosis in alveolar macrophages[J]. Mucosal Immunology, 2016, 9(4): 873-883.

[13] Grabiec A M, Hussell T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation[J]. Seminars in Immunopathology, 2016, 38(4): 409-423.

[14] Chen C Y, Huang K Y, Chen C C, *et.al*. The role of PM2.5 exposure in lung cancer: mechanisms, genetic factors, and clinical implications[J]. EMBO molecular medicine, 2025, 17(1): 31-40.

[15] Li Q, Zhu X, Song W, *et.al*. The P2X7 purinergic receptor: a potential therapeutic target for lung cancer[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2020, 146(11): 2731-2741.

[16] Albano G D, Gagliardo R P, Montalbano A M, *et.al*. Overview of the Mechanisms of Oxidative Stress: Impact in Inflammation of the Airway Diseases[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2022, 11(11): 2237.

[17] Buscetta M, Cristaldi M, Cimino M, *et.al*. Cigarette smoke promotes inflammasome-independent activation of caspase-1 and -4 leading to gasdermin D cleavage in human macrophages[J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2022, 36(9).

[18] Yu P, Zhang X, Liu N, *et.al*. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 128.

[19] Yan J, Wan P, Choksi S, *et.al*. Necroptosis and tumor progression[J]. Trends in Cancer, 2022, 8(1): 21-27.

[20] Khoury M K, Gupta K, Franco S R, *et.al*. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease[J]. The American Journal of Pathology, 2020, 190(2): 272-285.

[21] [90] Fritsch M, Günther S D, Schwarzer R, *et.al*. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis[J]. Nature, 2019, 575(7784): 683-687.

[22] Fu X, Hong W, Li S, *et.al*. Wood smoke particulate matter (WSPM2.5) induces pyroptosis through both Caspase-1/IL-1β/IL-18 and ATP/P2Y-dependent mechanisms in human bronchial epithelial cells[J]. Chemosphere, 2022, 307: 135726.

中国知网 https://www.cnki.net

[23] Zhou S yuan, Du J min, Li W jing, *et.al*. The roles and regulatory mechanisms of cigarette smoke constituents in vascular remodeling[J]. International Immunopharmacology, 2024, 140: 112784.

[24] Wei J, Tian Y, Wei J, *et.al*. Bilirubin regulates cell death type by alleviating macrophage mitochondrial dysfunction caused by cigarette smoke extract[J]. Redox Report: Communications in Free Radical Research, 2024, 29(1): 2382946.

[25] Cha S R, Jang J, Park S M, *et.al*. Cigarette Smoke-Induced Respiratory Response: Insights into Cellular Processes and Biomarkers[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2023, 12(6): 1210.

[26] Juan C A, Pérez de la Lastra J M, Plou F J, *et.al*. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4642.

[27] Cantin A M. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive[J]. Proceedings of the American Thoracic Society, 2010, 7(6): 368-375.

[28] Simone R E, Russo M, Catalano A, *et.al*. Correction: Lycopene Inhibits NF-kB-Mediated IL-8 Expression and Changes Redox and PPARγ Signalling in Cigarette Smoke-Stimulated Macrophages[J]. PloS One, 2013, 8(2).

[29] Aridgides D S, Mellinger D L, Armstrong D A, *et.al*. Functional and metabolic impairment in cigarette smoke-exposed macrophages is tied to oxidative stress[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 9624.

[30] Hosseini M J, Naserzadeh P, Salimi A, *et.al*. Toxicity of cigarette smoke on isolated lung, heart, and brain mitochondria: induction of oxidative stress and cytochrome c release[J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2013, 95(9): 1624-1637.

[31] Robinson A B, Johnson K D, Bennion B G, *et.al*. RAGE signaling by alveolar macrophages influences tobacco smoke-induced inflammation[J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2012, 302(11): L1192-1199.

[32] Richens T R, Linderman D J, Horstmann S A, *et.al*. Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2009, 179(11): 1011-1021.

[33] Kasper M, Barth K. Bleomycin and its role in inducing apoptosis and senescence in lung cells - modulating effects of caveolin-1[J]. Current Cancer Drug Targets, 2009, 9(3): 341-353.

中国知网 https://www.cnki.net

[34] Gao Y, Fan X, Gu W, *et.al*. Hyperoside relieves particulate matter-induced lung injury by inhibiting AMPK/mTOR-mediated autophagy deregulation[J]. Pharmacological Research, 2021, 167: 105561.

[35] Gao X, Zhu B, Wu Y, *et.al*. TFAM-Dependent Mitochondrial Metabolism Is Required for Alveolar Macrophage Maintenance and Homeostasis[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2022, 208(6): 1456-1466.

[36] Shotland A M, Fontenot A P, McKee A S. Pulmonary Macrophage Cell Death in Lung Health and Disease[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2021, 64(5): 547-556.

[37] Park J W, Kim H P, Lee S J, *et.al*. Protein kinase C alpha and zeta differentially regulate death-inducing signaling complex formation in cigarette smoke extract-induced apoptosis[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2008, 180(7): 4668-4678.

[38] Robb C T, Regan K H, Dorward D A, *et.al*. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation[J]. Seminars in Immunopathology, 2016, 38(4): 425-448.

[39] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicologic Pathology, 2007, 35(4): 495-516.

[40] Giordano L, Gregory A D, Pérez Verdaguer M, *et.al*. Extracellular Release of Mitochondrial DNA: Triggered by Cigarette Smoke and Detected in COPD[J]. Cells, 2022, 11(3): 369.

[41] Taniguchi A, Tsuge M, Miyahara N, *et.al*. Reactive Oxygen Species and Antioxidative Defense in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2021, 10(10): 1537.

[42] Schuermans S, Kestens C, Marques P E. Systemic mechanisms of necrotic cell debris clearance[J]. Cell Death & Disease, 2024, 15(8): 557.

[43] Asare P F, Tran H B, Hurtado P R, *et.al*. Inhibition of LC3-associated phagocytosis in COPD and in response to cigarette smoke[J]. Therapeutic Advances in Respiratory Disease, 2021, 15: 17534666211039769.

[44] Asare P F, Hurtado P R, Tran H B, *et.al*. Reduction in Rubicon by cigarette smoke is associated with impaired phagocytosis and occurs through lysosomal degradation pathway[J]. Clinical and Experimental Medicine, 2023, 23(7): 4041-4055.

[45] Martinet W, Schrijvers D M, De Meyer G R Y. Necrotic cell death in atherosclerosis[J]. Basic Research in Cardiology, 2011, 106(5): 749-760.

[46] Bolourani S, Brenner M, Wang P. The interplay of DAMPs, TLR4, and proinflammatory cytokines in pulmonary fibrosis[J]. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2021, 99(10): 1373-1384.

中国知网 https://www.cnki.net

[47] Sangiuliano B, Pérez N M, Moreira D F, *et.al*. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control[J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014: 821043.

[48] Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, *et.al*. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2091.

[49] Wu Q, Du J, Bae E J, *et.al*. Pyroptosis in Skeleton Diseases: A Potential Therapeutic Target Based on Inflammatory Cell Death[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(16): 9068.

[50] Yu Q, Zhao T, Liu M, *et.al*. Targeting NLRP3 Inflammasome in Translational Treatment of Nervous System Diseases: An Update[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 707696.

[51] Zhen H, Hu Y, Liu X, *et.al*. The protease caspase-1: Activation pathways and functions[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 717: 149978.

[52] Li X, Zhang P, Yin Z, *et.al*. Caspase-1 and Gasdermin D Afford the Optimal Targets with Distinct Switching Strategies in NLRP1b Inflammasome-Induced Cell Death[J]. Research (Washington, D.C.), 2022, 2022: 9838341.

[53] Xia S, Zhang Z, Magupalli V G, *et.al*. Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1[J]. Nature, 2021, 593(7860): 607-611.

[54] Mou Y, Liao W, Liang Y, *et.al*. Environmental pollutants induce NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis: Roles and mechanisms in various diseases[J]. The Science of the Total Environment, 2023, 900: 165851.

[55] Man S M, Karki R, Kanneganti T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. Immunological Reviews, 2017, 277(1): 61-75.

[56] Lu Z, Van Eeckhoutte H P, Liu G, *et.al*. Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2021, 204(6): 667-681.

[57] [126] Liu C, Li P, Zheng J, *et.al*. Role of necroptosis in airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease: focus on small-airway disease and emphysema[J]. Cell Death Discovery, 2022, 8(1): 363.

[58] Santos L D, Antunes K H, Muraro S P, *et.al*. TNF-mediated alveolar macrophage necroptosis drives disease pathogenesis during respiratory syncytial virus infection[J]. The European Respiratory Journal, 2021, 57(6): 2003764.

中国知网 https://www.cnki.net

[59] Tao H, Zhao H, Ge D, *et.al*. Necroptosis in pulmonary macrophages promotes silica-induced inflammation and interstitial fibrosis in mice[J]. Toxicology Letters, 2022, 355: 150-159.

[60] Wang J, Li X, Wang Y, *et.al*. Osteopontin aggravates acute lung injury in influenza virus infection by promoting macrophages necroptosis[J]. Cell Death Discovery, 2022, 8(1): 97.

[61] Wang Y, Wang X K, Wu P P, *et.al*. Necroptosis Mediates Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Responses in Macrophages[J]. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2020, 15: 1093-1101.

[62] Tao H, Zhao H, Ge D, *et.al*. Necroptosis in pulmonary macrophages promotes silica-induced inflammation and interstitial fibrosis in mice[J]. Toxicology Letters, 2022, 355: 150-159.

[63] Yang T, Xiang C G, Wang X H, *et.al*. RIPK1 inhibitor ameliorates pulmonary injury by modulating the function of neutrophils and vascular endothelial cells[J]. Cell Death Discovery, 2024, 10(1): 152.

[64] Sheikh K, Coxson H O, Parraga G. This is what COPD looks like[J]. Respirology (Carlton, Vic.), 2016, 21(2): 224-236.

[65] Salvi S. Tobacco Smoking and Environmental Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. Clinics in Chest Medicine, 2014, 35(1): 17-27.

[66] Spix B, Jeridi A, Ansari M, *et.al*. Endolysosomal Cation Channels and Lung Disease[J]. Cells, 2022, 11(2): 304.

[67] Koncz G, Jenei V, Tóth M, *et.al*. Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1169560.

[68] Addissouky T A, El Sayed I E T, Ali M M A, *et.al*. Oxidative stress and inflammation: elucidating mechanisms of smoking-attributable pathology for therapeutic targeting[J]. Bulletin of the National Research Centre, 2024, 48(1): 16.

[69] Nowak A, Pawliczak R. Cigarette smoking and oxidative stress[J]. Alergologia Polska - Polish Journal of Allergology, 2022, 9(2): 89-98.

[70] Zheng D J, Abou Taka M, Heit B. Role of Apoptotic Cell Clearance in Pneumonia and Inflammatory Lung Disease[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2021, 10(2): 134.

[71] Purnama C A, Meiliana A, Barliana M I, *et.al*. Update of cellular responses to the efferocytosis of necroptosis and pyroptosis[J]. Cell Division, 2023, 18(1): 5.

中国知网 https://www.cnki.net

[72] Wu X, Tian Y, Wang H, *et.al*. Dual Regulation of Nicotine on NLRP3 Inflammasome in Macrophages with the Involvement of Lysosomal Destabilization, ROS and α7nAChR[J]. Inflammation, 2025, 48(1): 61-74.

[73] Mei Q, Liu Z, Zuo H, *et.al*. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 797292.

[74] Perrot C Y, Karampitsakos T, Herazo-Maya J D. Monocytes and macrophages: emerging mechanisms and novel therapeutic targets in pulmonary fibrosis[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2023, 325(4): C1046-C1057.

[75] Li C, Xu J, Abdurehim A, *et.al*. TRPA1: A promising target for pulmonary fibrosis?[J]. European Journal of Pharmacology, 2023, 959: 176088.

[76] Gairola S, Sinha A, Kaundal R K. Linking NLRP3 inflammasome and pulmonary fibrosis: mechanistic insights and promising therapeutic avenues[J]. Inflammopharmacology, 2024, 32(1): 287-305.

[77] Yang G, Yang Y, Liu Y, *et.al*. Regulation of alveolar macrophage death in pulmonary fibrosis: a review[J]. Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death, 2023, 28(11-12): 1505-1519.

[78] Glasser S W, Hagood J S, Wong S, *et.al*. Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution[J]. The American Journal of Pathology, 2016, 186(5): 1066-1077.

[79] Mao Y, Yang D, He J, *et.al*. Epidemiology of Lung Cancer[J]. Surgical Oncology Clinics of North America, 2016, 25(3): 439-445.

[80] Zhu S, Yi M, Wu Y, *et.al*. Roles of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications on therapeutic strategies[J]. Experimental Hematology & Oncology, 2021, 10(1): 60.

[81] He Z, Zhang S. Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 741305.

[82] [151] Liu B Y, Chiou J Z, Huang K M, *et.al*. Effects of taurine against benzo[α]pyrene-induced cell cycle arrest and reactive oxygen species-mediated nuclear factor-kappa B apoptosis via reduction of mitochondrial stress in A549 cells[J]. The Chinese Journal of Physiology, 2022, 65(4): 199-208.

[83] Lv T, Fan R, Wu J, *et.al*. Tumor-Associated Macrophages: Key Players in the Non-Small Cell Lung Cancer Tumor Microenvironment[J]. Cancer Medicine, 2025, 14(3): e70670.

中国知网 https://www.cnki.net

[84] Zhou X, Wang X, Sun Q, *et.al*. Natural compounds: A new perspective on targeting polarization and infiltration of tumor-associated macrophages in lung cancer[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 151: 113096.

[85] Peng Z, Tan X, Xi Y, *et.al*. Role of pyroptosis-related cytokines in the prediction of lung cancer[J]. Heliyon, 2024, 10(10).

[86] Hu Y, Liu Y, Zong L, *et.al*. The multifaceted roles of GSDME-mediated pyroptosis in cancer: therapeutic strategies and persisting obstacles[J]. Cell Death & Disease, 2023, 14(12): 836.

中国知网 https://www.cnki.net