

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.12.006
文章编号: 1005-8982 (2026) 12-0034-09

实验研究·论著

氢溴酸山莨菪碱对敌草快诱导的小鼠巨噬细胞的保护作用及其机制探讨*

靳鑫¹, 熊显委¹, 陈施羽², 曹家军¹, 蒋昌华¹, 罗艳¹, 舒艾娅¹

(重庆大学附属涪陵医院 1.重症医学科, 2.心血管内科, 重庆 408000)

摘要: **目的** 探讨氢溴酸山莨菪碱 (Ani-HBr) 对敌草快 (DQ) 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 (PMs) 损伤的保护作用及其机制。**方法** 选取PMs进行培养, 用DQ刺激PMs 12 h后, 用不同浓度的Ani-HBr (10、20 μg/mL) 干预24 h。采用CCK-8法检测细胞存活率; 试剂盒检测ATP、ROS水平; 流式细胞术分析巨噬细胞极化M1 (F4/80CD86)和M2 (F4/80CD206)比例; Western blotting检测线粒体生物合成核心因子核呼吸因子1 (NRF1)、线粒体转录因子A (TFAM)、M1型[白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1β]和M2型[转化生长因子-β (TGF-β)、IL-10]巨噬细胞分泌细胞因子的表达, 以及NF-κB通路关键蛋白P65及其磷酸化形式p-P65的表达。**结果** DQ组细胞存活率低于Control组 ($P < 0.05$), DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组细胞存活率高于DQ组 ($P < 0.05$), 且DQ+Ani-HBr-20组细胞存活率高于DQ+Ani-HBr-10组 ($P < 0.05$)。DQ组ATP水平低于Control组 ($P < 0.05$), ROS水平高于Control组 ($P < 0.05$), DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组ATP水平均高于DQ组 ($P < 0.05$), ROS水平低于DQ组 ($P < 0.05$)。DQ组NRF1、TFAM蛋白相对表达量均低于Control组 ($P < 0.05$), DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组NRF1、TFAM蛋白相对表达量均高于DQ组 ($P < 0.05$)。DQ组P65、p-P65蛋白相对表达量均高于Control组 ($P < 0.05$), DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组P65、p-P65蛋白相对表达量均低于DQ组 ($P < 0.05$)。DQ组M1型巨噬细胞比例高于Control组 ($P < 0.05$), M2型巨噬细胞比例低于Control组 ($P < 0.05$), DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组M1型巨噬细胞比例均低于DQ组 ($P < 0.05$), M2型巨噬细胞比例均高于DQ组 ($P < 0.05$)。DQ组IL-6、IL-1β蛋白相对表达量均高于Control组 ($P < 0.05$), TGF-β和IL-10蛋白相对表达量均低于Control组 ($P < 0.05$)。DQ+Ani-HBr-10组、DQ+Ani-HBr-20组IL-6、IL-1β蛋白相对表达量均低于DQ组 ($P < 0.05$), TGF-β和IL-10蛋白相对表达量均高于DQ组 ($P < 0.05$)。**结论** Ani-HBr对DQ诱导的PMs损伤具有保护作用, 其机制可能与上调NRF1/TFAM蛋白表达、改善线粒体功能、抑制NF-κB通路激活, 以及调节巨噬细胞极化平衡有关。

关键词: 氢溴酸山莨菪碱; 敌草快; 巨噬细胞; 作用机制

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

Effects and mechanisms of Ani-HBr on DQ-induced injury in murine macrophages*

Jin Xin¹, Xiong Xian-wei¹, Chen Shi-yu², Cao Jia-jun¹, Jiang Chang-hua¹, Luo Yan¹, Shu Ai-ya¹
(1. Department of Critical Care Medicine, 2. Department of Cardiovascular Medicine, Chongqing University Affiliated Fuling Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract: Objective To investigate protective effects of anisodamine hydrobromide (Ani-HBr) against diquat (DQ)-induced injury in murine peritoneal macrophages (PMs) and to explore the underlying mechanisms.

收稿日期: 2026-01-25

* 基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (CSTB2024NSCQ-MSX0938)

[通信作者] 舒艾娅, E-mail: 48231531@qq.com

Methods PMs were cultured and stimulated with DQ for 12 h, followed by intervention with different concentrations of Ani-HBr (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Cell viability was measured by the CCK-8 assay. ATP and ROS levels were detected using commercial kits. Macrophage polarization was analyzed by flow cytometry using M1 (F4/80CD86) and M2 (F4/80CD206) markers. Western blotting was performed to determine the expressions of mitochondrial biogenesis factors nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM), M1-type cytokines [interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β)], M2-type cytokines [transforming growth factor beta (TGF- β) and interleukin-10 (IL-10)], and proteins associated with the NF- κ B pathway including P65 and phosphorylated P65 (p-P65). **Results** Cell viability was significantly lower in the DQ group than in the control group ($P < 0.05$). Compared with the DQ group, cell viability was significantly increased in both the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups ($P < 0.05$). In addition, cell viability was higher in the DQ+Ani-HBr-20 group than in the DQ+Ani-HBr-10 group ($P < 0.05$). ATP levels were significantly lower, and ROS levels were significantly higher in the DQ group than in the control group (both $P < 0.05$). Compared with the DQ group, ATP levels were significantly increased, and ROS levels were significantly decreased in the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups (all $P < 0.05$). The expression levels of NRF1 and TFAM were significantly lower in the DQ group than in the control group ($P < 0.05$), whereas both were significantly increased in the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups compared with the DQ group ($P < 0.05$). The expression levels of P65 and p-P65 were significantly higher in the DQ group than in the control group ($P < 0.05$), while both were significantly lower in the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups than in the DQ group ($P < 0.05$). The proportion of M1 macrophages was significantly increased and the proportion of M2 macrophages was significantly decreased in the DQ group compared with the control group ($P < 0.05$). Compared with the DQ group, the proportions of M1 macrophages were significantly decreased and the proportions of M2 macrophages were significantly increased in the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups ($P < 0.05$). The relative protein expression levels of IL-6 and IL-1 β were significantly higher, whereas those of TGF- β and IL-10 were significantly lower, in the DQ group than in the control group ($P < 0.05$). Compared with the DQ group, the relative protein expression levels of IL-6 and IL-1 β were significantly decreased, while those of TGF- β and IL-10 were significantly increased, in the DQ+Ani-HBr-10 and DQ+Ani-HBr-20 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ani-HBr exerts significant protective effects against DQ-induced injury in PMs, which may be associated with upregulation of NRF1/TFAM expression, improvement of mitochondrial function, inhibition of NF- κ B pathway activation, and modulation of macrophage polarization balance.

Keywords: anisodamine hydrobromide; diquat; macrophages; mechanism of action

敌草快 (Diquat, DQ) 是一种广泛使用的联吡啶类除草剂, 其在体内代谢后通过氧化还原循环反应持续产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 引发严重的氧化应激反应^[1]。DQ 通过细胞色素 P450 还原酶介导的单电子还原形成自由基阳离子, 迅速与分子氧反应产生超氧阴离子, 进而生成过氧化氢和羟自由基^[2]。目前, DQ 中毒已成为急性肝损伤的主要原因之一, 其毒性机制涉及氧化应激、线粒体功能障碍和炎症反应等病理过程^[1]。研究表明, DQ 通过破坏细胞内抗氧化系统并抑制线粒体呼吸链复合物活性, 导致线粒体功能障碍 [腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 下降、ROS 升高] 和细胞凋亡^[3]。在肝脏免疫微环境中, 库普弗细胞作为驻留巨噬细胞, 是重要的免疫调节者, DQ 诱导的氧化应激可导致巨噬细胞功能紊乱, 加重肝脏炎症反应^[4]。

巨噬细胞的极化状态 (促炎型 M1 和抗炎型 M2) 决定其在炎症进程中的角色^[5]。M1 巨噬细胞通过分泌白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-1 β 等促炎因子, 加剧炎症反应; 而 M2 巨噬细胞通过分泌 IL-10、TGF- β 促进组织修复^[6]。近年来研究表明, 巨噬细胞极化不仅受细胞因子驱动, 其能量代谢状态 (ATP 水平、线粒体活性) 同样是决定功能的重要因素^[7]。M1 型巨噬细胞依赖糖酵解供能, 而 M2 型巨噬细胞维持完整的三羧酸循环, 主要依赖氧化磷酸化供能^[8]。然而, 目前尚未有研究阐明 DQ 诱导的氧化应激是否通过影响巨噬细胞线粒体功能导致极化失衡。

线粒体功能的维持依赖于线粒体生物合成的动态平衡, 该过程主要由核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF1) 和线粒体转录因子 A

(mitochondrial transcription factor A, TFAM) 共同调控^[9]。NRF1 作为线粒体生物合成的关键调控因子,其缺失可导致 NF- κ B 通路激活,提示 NRF1 在正常状态下对 NF- κ B 通路具有抑制作用^[10]。NF- κ B 通路是调控炎症反应的核心信号轴,其激活可驱动巨噬细胞向 M1 型极化并促进促炎因子表达^[11]。考虑到 DQ 中毒的关键是氧化应激,通过调控 NRF1/TFAM 轴来促进线粒体生物合成或许能成为一种有效的细胞保护方法。

氢溴酸山莨菪碱 (anisodamine hydrobromide, Ani-HBr) 是一种临床常用的微循环改善剂,已被证实具有抗氧化和抗炎作用^[12]。研究表明,Ani-HBr 能够减少 ROS 诱导的氧化应激,并通过抑制炎症信号通路减轻组织损伤^[13]。然而,目前关于 Ani-HBr 在巨噬细胞水平上是否具有直接保护作用及其具体机制尚不明确。

基于上述背景,本研究假设: Ani-HBr 通过激活 NRF1/TFAM 轴,改善线粒体功能,抑制 NF- κ B 通路激活,调节巨噬细胞极化平衡 (M1/M2),从而保护腹腔巨噬细胞 (peritoneal macrophages, PMs) 免受 DQ 诱导的损伤。本研究旨在探讨 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只 6~8 周龄雄性 ICR 小鼠[实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2020-0009, 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2017-0046], 体重 (18~22) g, 购自江苏华创信诺医药科技有限公司, 在 SPF 级动物实验室内饲养。小鼠自由采食饮水, 温度 21~23 °C, 湿度 60%~65%, 12 h/12 h 光暗循环。适应性饲养 1 周后进行实验。本研究涉及的动物实验程序经重庆大学附属涪陵医院伦理委员会批准 (2025CDFSLYEC-68)。

1.2 主要试剂与仪器

DQ、氢溴酸山莨菪碱 (美国 MCE 公司, 货号: HY-136372、HY-N0584A), 兔抗 IL-1 β 多克隆抗体、兔抗 IL-6 多克隆抗体、兔抗 TGF- β 多克隆抗体、兔抗 NRF1 多克隆抗体、兔抗 TFAM 多克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 26048-1-AP、26404-1-AP、81746-2-RR、12936-1-AP、22586-

1-AP), 兔抗 IL-10 多克隆抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号: A2171), 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号: ab8226), 兔抗 NF- κ B P65 多克隆抗体、兔抗 p-P65 多克隆抗体 (上海碧云天生物技术公司, 货号: AN365、AN371), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗大鼠 IgG (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: SA00001-2-HRP、SA00001-1、SA00001-15-HRP), FITC 标记 F4/80 抗体-APC 标记 CD86 抗体 (北京 BIOLEGEND 生物科技有限公司, 货号: 123107、105011), APC 标记 CD206 抗体 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号: E-AB-F1135E), ATP 检测试剂盒、ROS 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术公司, 货号: S0026、S0033S)。流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司, 型号: CytoFLEX), 酶标检测仪 (无锡 Diatek 公司, 型号: DR-3518GL), 电泳仪 (上海天能公司, 型号: EPS-200), 电转仪 (上海天能公司, 型号: EPS-300), 一体式化学发光成像系统 (上海天能公司, 型号: 5200), 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司, 型号: 8000), 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司, 型号: Scientific Micro 21R), 常温低速台式离心机 (北京白洋离心机厂, 型号: BY-160A), 普通荧光显微镜 (日本 Nikon 公司, 型号: Ti2)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 PMs 提取 参照文献[14]的方法提取 PMs。每组实验使用来源于 5 只独立小鼠的 PMs 进行生物学重复实验。将小鼠脱颈椎处死, 并浸入 75% 乙醇中 3 min, 取出小鼠沥干后用注射器吸取 10 mL 的生理盐水注入小鼠腹腔中, 轻揉小鼠腹部 3 min 后, 用注射器将腹腔液吸入离心管中, 在 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬, 细胞计数。每只小鼠提取的 PMs 分别用于全部实验分组, 确保每只小鼠的细胞在各组间平行处理。提取的 PMs 常规培养, 实验所用细胞处于对数生长期。

1.3.2 药物制备 DQ 处理液: 将 DQ 粉末溶解于无菌 PBS 中, 配制成 10 μ mol/L 的工作液; Ani-HBr 处理液: 将 Ani-HBr 溶解于无菌水中, 分别配制成 10、20 μ g/mL 工作液。

1.3.3 DQ 处理构建细胞中毒模型 将提取的 PMs 按 80% 细胞密度铺板, 培养过夜使其贴壁后加入 DQ 10 $\mu\text{mol/L}$, 刺激 12 h 后再进行后续实验。

1.3.4 Ani-HBr 处理巨噬细胞及实验分组 DQ 刺激 12 h 后, 吸去孔内液体, 用 100 μL PBS 冲洗 2 次, 以彻底去除残留的 DQ, 根据分组加入不同浓度的 Ani-HBr。将来源于每只小鼠的 PMs 分为以下 4 组进行处理, 每组 5 只: Control 组[加入等体积的无菌 PBS (DQ 的溶剂) 和无菌水 (Ani-HBr 的溶剂)], DQ 组 (PMs 用 10 $\mu\text{mol/L}$ DQ 处理 12 h)、DQ+Ani-HBr-10 组 (PMs 用 10 $\mu\text{mol/L}$ DQ 处理 12 h 后, 再加入 10 $\mu\text{g/mL}$ Ani-HBr 处理 24 h)、DQ+Ani-HBr-20 组 (PMs 用 10 $\mu\text{mol/L}$ DQ 处理 12 h 后, 再加入 20 $\mu\text{g/mL}$ Ani-HBr 处理 24 h)。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞存活率 取对数生长期 PMs, 在 96 孔板中以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种细胞, 100 μL /孔, 每组设 3 个平行复孔, 在常规培养条件 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳) 下进行干预。之后向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 充分混匀后, 继续在培养箱中避光孵育 3 h, 随后用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。设置标准曲线, 计算细胞存活率。

1.3.6 ATP 水平检测 用 0.25% 胰酶消化收集各组 PMs, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, 以 1×10^6 个/mL 的细胞密度重悬于 PBS 中。将 ATP 裂解缓冲液加入细胞中混匀, 冰上孵育 30 min。细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 然后按照 ATP 测定试剂盒具体步骤测量上清液中的 ATP 水平。结果使用 ATP 标准溶液对 ATP 测量值进行标准化计算, 并使用 BCA 蛋白测定试剂盒检测。

1.3.7 ROS 水平检测 用 0.25% 胰酶消化收集各组 PMs, 以 1×10^5 个/mL 的细胞密度重悬于 PBS 中。加入 200 μL 的 DCFH-DA 探针 (50 $\mu\text{g/mL}$), 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。随后用 PBS 洗涤 1 次, 再用荧光显微镜检测 ROS 水平。

1.3.8 PMs 极化状态检测 用 0.25% 胰酶消化收集各组 PMs, 用 PBS 洗涤 3 次, 离心后加入 2 mL 4% 多聚甲醛固定 5 min。固定好后用 PBS 洗涤 3 次, 离心后加入 2 mL 0.1% Triton, 通透 5 min, PBS 洗涤 3 次。离心后加入 CD206 (0.125 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) 或 CD86 (0.25 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) 抗体重悬, 避光在冰上孵育 30 min, PBS

洗涤 2 次。离心后加入 300 μL PBS 重悬, 流式细胞术检测细胞极化状态。

1.3.9 Western blotting 检测蛋白表达 收集各组 PMs 并用冰预冷 PBS 洗涤 3 次, 之后在冰上操作, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞后提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。以 30 μg 为上样量, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 0.45 $\mu\text{mol/L}$ PVDF 转膜 (恒压 100 V, 100 min), 用 5% (0.05 $\mu\text{g/mL}$) 脱脂牛奶室温摇床封闭 90 min。TBST 洗膜后孵育一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 其中 NRF1、TFAM、IL-6、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 、P65、p-P65、 β -actin 的抗体稀释浓度分别是 1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:500、1:1 000、1:10 000。TBST 洗膜后加对应的二抗 (1:8 000) 室温摇床孵育 1 h, 洗膜后化学发光显色。使用 Image J 软件分析灰度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 10.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用独立样本 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 细胞存活率的影响

Control 组、DQ 组、DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组细胞存活率分别为 (100.00 \pm 5.78)%、(74.92 \pm 4.58)%、(82.42 \pm 4.06)%、(92.93 \pm 5.19)% , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 45.343$, $P = 0.001$)。DQ 组细胞存活率低于 Control 组 ($P < 0.05$), 表明 DQ 对 PMs 具有显著的细胞毒性作用; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组细胞存活率高于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且 DQ+Ani-HBr-20 组细胞存活率高于 DQ+Ani-HBr-10 组 ($P < 0.05$)。表明 Ani-HBr 能有效逆转 DQ 对细胞的毒性作用, 并且剂量越高, 保护效果越好。

2.2 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 线粒体 ATP、ROS 水平的影响

各组 ATP、ROS 水平比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DQ 组 ATP 水平低于 Control 组 ($P < 0.05$), ROS 水平高于 Control 组 ($P < 0.05$), 提示 DQ 对线粒体功能具有显著损伤作用; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组

ATP 水平均高于 DQ 组 ($P < 0.05$), ROS 水平低于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。表明 Ani-HBr 能显著改善 DQ 对 PMs 线粒体功能的损伤, 且剂量越高表示保护效果越好。见表 1。

表 1 各组 ATP、ROS 水平比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

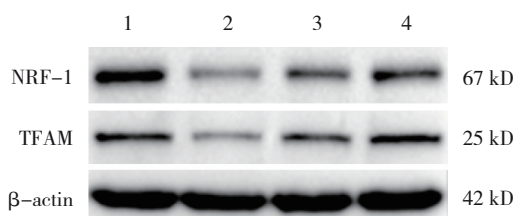
组别	ATP/(nmol/mg)	ROS
Control 组	137.90 ± 9.45	123.70 ± 6.06
DQ 组	79.86 ± 5.83	199.30 ± 4.99
DQ+Ani-HBr-10 组	109.90 ± 10.72	182.60 ± 6.99
DQ+Ani-HBr-20 组	128.30 ± 9.07	146.30 ± 1.66
F 值	24.439	124.521
P 值	0.000	0.000

2.3 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 线粒体功能相关蛋白 NRF1、TFAM 表达的影响

各组 NRF1、TFAM 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DQ 组 NRF1、TFAM 蛋白相对表达量均低于 Control 组 ($P < 0.05$), 表明 DQ 抑制了线粒体生物合成相关基因的表达; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组 NRF1、TFAM 蛋白相对表达量均高于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。进一步证实了 Ani-HBr 能激活线粒体生物合成核心因子, 从而改善线粒体功能。见表 2 和图 1。

表 2 各组 NRF1、TFAM 蛋白相对表达量比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	NRF1 蛋白	TFAM 蛋白
Control 组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08
DQ 组	0.40 ± 0.02	0.55 ± 0.02
DQ+Ani-HBr-10 组	0.64 ± 0.05	0.71 ± 0.03
DQ+Ani-HBr-20 组	0.87 ± 0.05	0.92 ± 0.06
F 值	78.885	46.493
P 值	0.000	0.000



1: Control 组; 2: DQ 组; 3: DQ+Ani-HBr-10 组; 4: DQ+Ani-HBr-20 组。

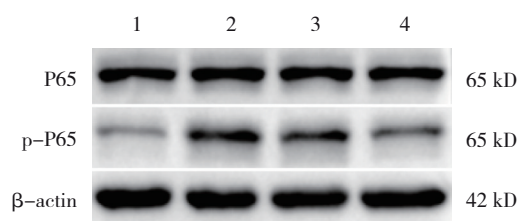
图 1 NRF1、TFAM 蛋白条带图

2.4 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 NF-κB 通路激活的影响

各组 P65、p-P65 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DQ 组 P65、p-P65 蛋白相对表达量均高于 Control 组 ($P < 0.05$), 表明 DQ 强烈激活了 NF-κB 炎症通路; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组 P65、p-P65 蛋白相对表达量均低于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。表明高剂量的 Ani-HBr 能显著抑制 NF-κB 通路的过度激活。见表 3 和图 2。

表 3 各组 P65、p-P65 蛋白相对表达量比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	P65 蛋白	p-P65 蛋白
Control 组	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.08
DQ 组	1.18 ± 0.06	2.90 ± 0.19
DQ+Ani-HBr-10 组	1.01 ± 0.09	2.47 ± 0.20
DQ+Ani-HBr-20 组	0.99 ± 0.05	1.85 ± 0.14
F 值	6.592	77.579
P 值	0.013	0.000



1: Control 组; 2: DQ 组; 3: DQ+Ani-HBr-10 组; 4: DQ+Ani-HBr-20 组。

图 2 P65、p-P65 蛋白条带图

2.5 流式细胞术检测 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 极化状态的影响

各组 M1 型、M2 型巨噬细胞比例比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DQ 组 M1 型巨噬细胞比例高于 Control 组 ($P < 0.05$), M2 型巨噬细胞比例低于 Control 组 ($P < 0.05$), 提示 DQ 诱导了明显的促炎极化; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组 M1 型巨噬细胞比例均低于 DQ 组 ($P < 0.05$), M2 型巨噬细胞比例均高于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。表明高剂量 Ani-HBr 能更有效地促进巨噬细胞向抗炎 M2 型极化。见图 3 和表 4。

2.6 Western blotting 实验检测 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 极化状态的影响

各组 M1 型、M2 型分泌细胞因子蛋白相对表达

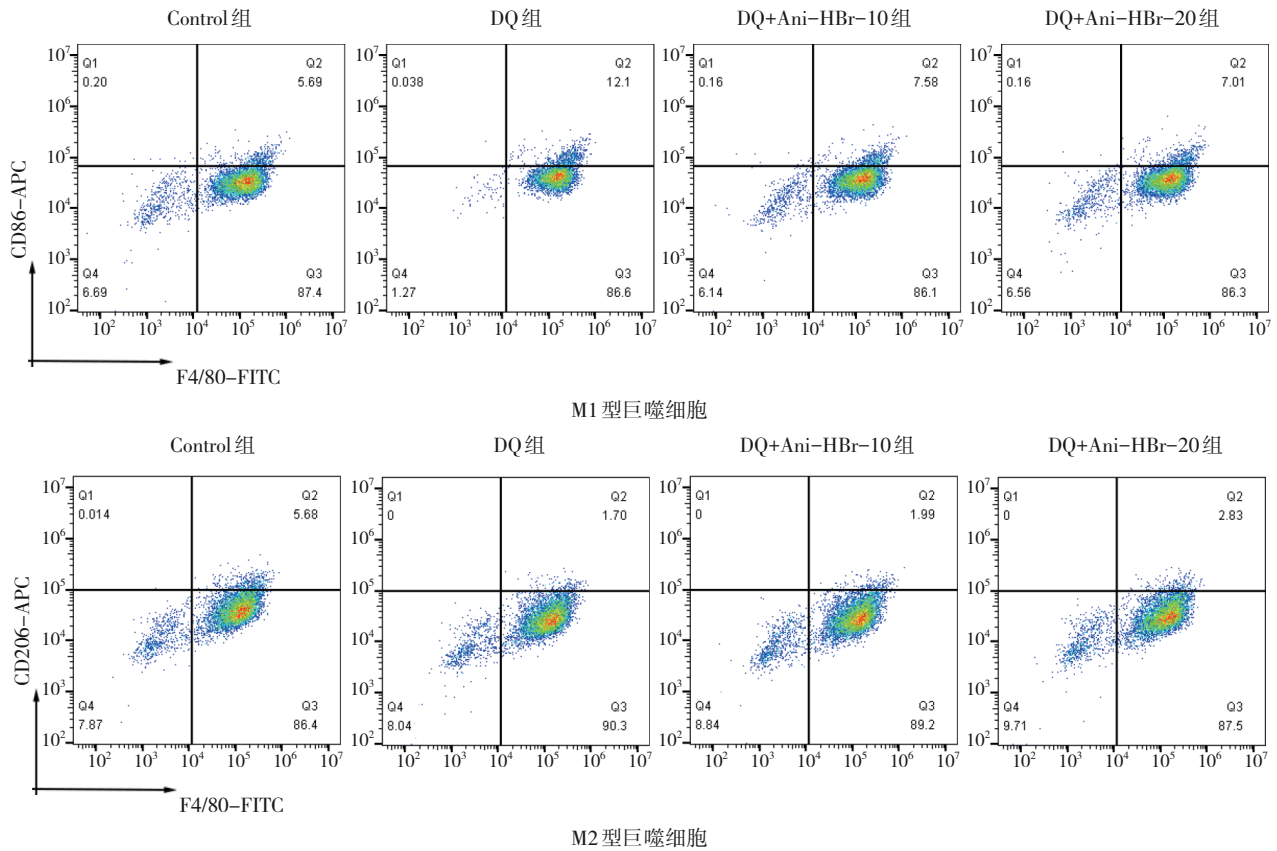


图 3 流式细胞术检测 PMs 中 M1 型、M2 型巨噬细胞比例

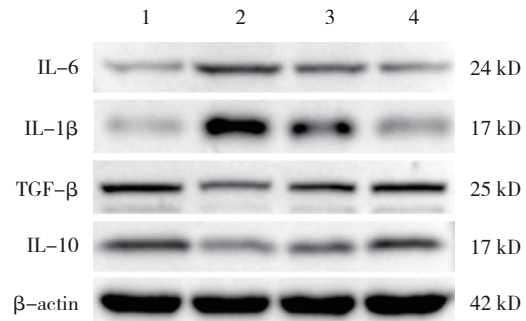
表 4 各组 M1 型、M2 型巨噬细胞比例比较 (n=5, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	M1 型(CD86)	M2 型(CD206)
Control 组	5.49 ± 0.36	4.77 ± 0.79
DQ 组	11.47 ± 0.57	1.30 ± 0.35
DQ+Ani-HBr-10 组	8.27 ± 0.72	2.14 ± 0.14
DQ+Ani-HBr-20 组	6.69 ± 0.29	3.20 ± 0.49
F 值	76.506	26.571
P 值	0.000	0.000

量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DQ 组 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均高于 Control 组 ($P < 0.05$), TGF- β 、IL-10 蛋白相对表达量均低于 Control 组 ($P < 0.05$), 表明 DQ 诱导了促炎因子分泌; DQ+Ani-HBr-10 组、DQ+Ani-HBr-20 组 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均低于 DQ 组 ($P < 0.05$), TGF- β 、IL-10 蛋白相对表达量均高于 DQ 组 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。进一步证实了 Ani-HBr 能显著抑制促炎因子分泌并促进抗炎因子分泌, 恢复巨噬细胞的极化平衡。见表 5 和图 4。

表 5 各组 M1 型、M2 型分泌细胞因子蛋白相对表达量比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	M1 型分泌细胞因子蛋白		M2 型分泌细胞因子蛋白	
	IL-6	IL-1 β	TGF- β	IL-10
Control 组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03
DQ 组	2.70 ± 0.17	4.25 ± 0.24	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.03
DQ+Ani-HBr-10 组	2.17 ± 0.18	3.52 ± 0.31	0.68 ± 0.03	0.67 ± 0.03
DQ+Ani-HBr-20 组	1.53 ± 0.10	2.04 ± 0.19	0.85 ± 0.07	0.82 ± 0.06
F 值	81.870	129.222	48.352	82.461
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000



1: Control 组; 2: DQ 组; 3: DQ+Ani-HBr-10 组;
4: DQ+Ani-HBr-20 组。

图 4 M1 型、M2 型分泌细胞因子蛋白条带图

3 讨论

线粒体生物合成障碍及 NF- κ B 通路过度激活是 DQ 诱导巨噬细胞损伤的关键环节，而调控 NRF1/TFAM 信号轴可能是有效的干预策略。本研究发现，DQ 暴露显著降低了 PMs 的细胞存活率。这与既往研究一致，即 DQ 通过破坏细胞内抗氧化防御系统并抑制线粒体呼吸链复合物活性，最终导致细胞凋亡^[13]。深入机制研究表明，DQ 干预后 PMs 出现明显的线粒体功能障碍，表现为 ATP 水平降低，而 ROS 水平升高，同时 NRF1 与 TFAM 蛋白表达受到显著抑制。

线粒体作为细胞能量代谢的核心细胞器，其功能的维持依赖于线粒体生物合成的动态平衡^[15]。PGC-1 α -NRF1-TFAM 信号轴是调控线粒体生物合成的关键通路，其中 NRF1 作为核编码的转录因子，可直接激活 TFAM 的转录，而 TFAM 进入线粒体后负责调控线粒体 DNA 的复制与转录，进而影响 ATP 生成^[16]。研究表明，NRF1 诱导的线粒体生物发生能够显著改善线粒体功能障碍，减少线粒体 ROS 产生，并维持线粒体膜电位稳定^[17]。本研究中 DQ 抑制 NRF1、TFAM 表达，导致线粒体生物合成受损，ATP 生成减少而 ROS 累积，形成恶性循环，进一步加剧细胞损伤。

此外，本研究发现 DQ 激活了 NF- κ B 炎症通路，表现为 p-P65 表达水平显著上调。NF- κ B 通路是调控炎症反应的核心信号轴，NF- κ B 与抑制蛋白 I κ B 结合滞留于细胞质中；当受到 ROS 等刺激时，I κ B 激酶复合物磷酸化 I κ B，导致其降解并释放 NF- κ B 二聚体，使其转位入核启动促炎基因的转录^[18]。DQ 诱导的大量 ROS 生成通过磷酸化和降解 I κ B- α ，促进 NF- κ B 的核转位，进而驱动下游促炎细胞因子高表达^[15]。本研究中，DQ 激活 NF- κ B 通路后，诱导 PMs 向促炎性 M1 型极化，导致 M1 型细胞因子 IL-6、IL-1 β 分泌增加。

巨噬细胞的极化状态（促炎型 M1 与抗类型 M2）是决定其在炎症进程中角色的关键因素^[19]。M1 型巨噬细胞主要分泌 IL-6、IL-1 β 等促炎细胞因子，放大炎症反应并可能导致组织损伤；而 M2 型巨噬细胞则通过分泌 IL-10、TGF- β 等抗炎因子促进组织修复和炎症消退^[20]。近年来研究揭示，巨噬细胞的极化不仅受细胞因子驱动，其内部的能

量代谢状态同样是决定其功能表型的重要因素^[21]。M1 巨噬细胞主要依赖糖酵解快速产生 ATP，伴随 ROS 生成增加和氧化磷酸化受抑；而 M2 巨噬细胞则维持完整的三羧酸循环，主要依赖氧化磷酸化和脂肪酸氧化供能^[22]。本研究中 DQ 诱导的线粒体功能障碍（ATP 下降、ROS 升高）可能通过代谢重编程驱动巨噬细胞向 M1 表型极化，而 M1 极化后进一步释放促炎因子，形成炎症放大环路。

本研究的重要发现是 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 损伤具有显著的保护作用。干预实验显示，与 DQ 组相比，Ani-HBr 能够剂量依赖性地逆转上述损伤。高剂量 Ani-HBr（20 μ g/mL）尤为有效，显著提高了 PMs 的细胞存活率。既往研究表明，山萘萆碱具有抗氧化和抗炎作用，在博来霉素诱导的急性肺损伤模型中，山萘萆碱通过增强超氧化物歧化酶和谷胱甘肽活性，提升内源性抗氧化防御能力，减少 ROS 诱导的氧化应激^[23]。此外，山萘萆碱在脂多糖诱导的胰腺腺泡细胞损伤中，通过抑制 NLRP3 炎症小体激活和 NF- κ B 信号通路，减轻细胞凋亡和炎症反应^[24]。

本研究进一步揭示了 Ani-HBr 发挥保护作用的深层机制。首先，Ani-HBr 显著恢复 PMs 的 ATP 水平并降低 ROS 水平，表明其能够改善 DQ 诱导的线粒体功能障碍。更为重要的是，Ani-HBr 显著上调了 NRF1、TFAM 蛋白表达，提示 Ani-HBr 可能通过激活 PGC-1 α -NRF1-TFAM 信号轴促进线粒体生物合成。研究表明，NRF1 过表达可增加线粒体质量，增强氧化磷酸化和 ATP 产生，同时减少线粒体 ROS 生成和线粒体膜电位去极化^[9]。NRF1 诱导的线粒体生物发生通过恢复细胞能量代谢稳态，可有效对抗氧化应激诱导的细胞损伤^[16]。本研究中 Ani-HBr 上调 NRF1/TFAM 表达，可能通过增强线粒体生物合成能力，恢复线粒体功能，从而保护 PMs 免受 DQ 损伤。

其次，Ani-HBr 抑制了 NF- κ B 通路的磷酸化激活，表现为 p-P65 表达水平下降。这一发现与山萘萆碱在脂多糖诱导的胰腺腺泡细胞损伤中的抗炎机制一致^[24]。值得注意的是，NRF1/TFAM 轴的激活与 NF- κ B 通路抑制之间存在密切联系。研究表明，NRF1 诱导的线粒体生物合成能够通过改善线粒体功能、降低 ROS 水平，进而减少 NF- κ B 的激

活; 同时, 优化的线粒体功能可减少促炎因子的产生, 形成负向调控环路^[25]。此外, NF- κ B 与 NRF1 之间存在双向调控关系: 适度的 NF- κ B 激活可在早期通过结合 NRF1 启动子区域促进其转录, 从而启动线粒体生物合成以应对炎症损伤; 然而, 持续的 NF- κ B 过度激活则会抑制 NRF1/TFAM 轴, 导致线粒体功能障碍^[25]。本研究中 Ani-HBr 通过上调 NRF1/TFAM 表达并抑制 NF- κ B 过度激活, 可能打破了这一恶性循环, 实现了对线粒体功能和炎症状态的双重改善。

最后, Ani-HBr 调节了巨噬细胞的极化平衡。本研究发现, Ani-HBr 诱导 PMs 向抗炎性 M2 型极化, 提升了 M2 型细胞因子 TGF- β 和 IL-10 的分泌。这种 M2 极化表型的转变有助于促进炎症消退和组织修复^[26]。研究表明, M2 型巨噬细胞极化依赖于氧化磷酸化和脂肪酸氧化供能^[22]。而 Ani-HBr 通过改善线粒体功能、恢复 ATP 水平, 可能为极化提供了有利的代谢基础。此外, Ani-HBr 抑制 NF- κ B 通路激活, 可减少促炎信号对 M1 极化的驱动, 同时降低的 ROS 水平也有助于减轻氧化应激诱导的 M1 型巨噬细胞极化。

综上所述, 本研究系统阐明了 Ani-HBr 对 DQ 诱导的 PMs 损伤的保护作用及其机制。Ani-HBr 通过上调 NRF1/TFAM 蛋白表达促进线粒体生物合成, 改善线粒体功能 (恢复 ATP、降低 ROS), 进而抑制 NF- κ B 通路的过度激活, 最终调节巨噬细胞极化平衡 (抑制 M1 型、促进 M2 型), 实现对 PMs 的全面保护。这一发现不仅丰富了 Ani-HBr 的药理作用机制, 也为 DQ 中毒的治疗提供了新的潜在靶点和理论依据。未来的研究可通过构建小鼠 DQ 中毒模型进一步验证 Ani-HBr 的体内保护作用, 并通过基因编辑技术进一步确认 NRF1/TFAM 轴在其中的核心地位, 从而有望进一步确立其因果关联。

参 考 文 献 :

- [1] 白丽花, 陈阳, 黄思佳, 等. 活性氧在敌草快中毒中的作用机制研究进展[J]. 临床急诊杂志, 2022, 23(8): 603-608.
- [2] HAN S Y, DONG D, LIU Z N. Molecular mechanisms in diquat-induced organs injury: insights into cell signaling and potential therapeutic agents[J]. Cell Biol Toxicol, 2025, 41(1): 160.
- [3] GOU F Y, CAI F Z, LI X, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes involve in oxidative stress-induced intestinal barrier injury and mitochondrial dysfunction under diquat exposing[J]. Environ Toxicol, 2024, 39(7): 3906-3919.
- [4] LI Z M, XIE Z C, LI Y Y, et al. Engineered-macrophage-escorted rotaxane nanoscavengers for precise diquat detoxification[J]. Adv Mater, 2025, 37(38): e2506466.
- [5] LUO M, ZHAO F K, CHENG H, et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1352946.
- [6] WANG L, YANG K, XIE X X, et al. Macrophages as multifaceted orchestrators of tissue repair: bridging inflammation, regeneration, and therapeutic innovation[J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 8945-8959.
- [7] LIU Y, XU R Y, GU H Y, et al. Metabolic reprogramming in macrophage responses[J]. Biomark Res, 2021, 9(1): 1.
- [8] ZHANG B, LIU L H, COOKE F L, et al. The boundary conditions of high-performance work systems-organizational citizenship behavior relationship: a multiple-perspective exploration in the Chinese context[J]. Front Psychol, 2021, 12: 743457.
- [9] MASSARO M, BAUDO G, LEE H, et al. Nuclear respiratory factor-1 (NRF1) induction drives mitochondrial biogenesis and attenuates amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and neurotoxicity[J]. Neurotherapeutics, 2025, 22(2): e00513.
- [10] 程康, 朱俐, 王雪婷. 核呼吸因子 1 调控 NF- κ B 介导 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤[J]. 生理学报, 2022, 74(3): 401-410.
- [11] CIARAMELLANO F, LEUTI A, KURTZ A D E, et al. Probing native CB₂ receptor mobility in plasma membranes of living cells by fluorescence recovery after photobleaching[J]. ChemBiochem, 2025, 26(8): e202400921.
- [12] CHEN Y, WENG D L, SHI W, et al. Integrative network pharmacology and multi-omics reveal anisodamine hydrobromide's multi-target mechanisms in sepsis[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 27996.
- [13] QIU Y, OUYANG Z, ZHONG J, et al. Anisodamine hydrobromide attenuates oxidative stress and proinflammatory cytokines in septic rats induced by cecal ligation and puncture[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2022, 68(12): 54-60.
- [14] KIM D M, LEE J H, PAN Q, et al. Nutrient-sensing growth hormone secretagogue receptor in macrophage programming and meta-inflammation[J]. Mol Metab, 2024, 79: 101852.
- [15] GLEASON A, RICHTER F, BELLER N, et al. Detection of neurologic changes in critically ill infants using deep learning on video data: a retrospective single center cohort study[J]. EClinicalMedicine, 2024, 78: 102919.
- [16] HAN X Q, ZHANG M, LIU D W, et al. PGC-1 alpha regulates mitochondrial biogenesis to promote silica-induced pulmonary fibrosis[J]. Toxicol Res (Camb), 2025, 14(3): tfaf070.
- [17] SUBHANI M, DHANDA A, KING J A, et al. Association between glucagon-like peptide-1 receptor agonists use and change in alcohol consumption: a systematic review[J]. EClinicalMedicine, 2024, 78: 102920.
- [18] FUJITA R, OTA S, YAMAMOTO Y, et al. Factors associated

- with physical activity following total knee arthroplasty for knee osteoarthritis: a longitudinal study[J]. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2024, 25(1): 178.
- [19] VOLKMANN E R, TASHKIN D P, SILVER R, et al. Sex differences in clinical outcomes and biological profiles in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: a post-hoc analysis of two randomised controlled trials[J]. *Lancet Rheumatol*, 2022, 4(10): e668-e678.
- [20] ANTHONY G, ARONSON J K, BRITAIN R, et al. Preventable suicides involving medicines: a systematic case series of coroners' reports in England and Wales[J]. *Public Health Pract (Oxf)*, 2024, 7: 100491.
- [21] JIN J, WANG J N, CHENG R Y, et al. Orlistat and ezetimibe could differently alleviate the high-fat diet-induced obesity phenotype by modulating the gut microbiota[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 908327.
- [22] CARNAUBA R A, SARTI F M, COUTINHO C P, et al. Associations between polyphenol intake, cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil) [J]. *J Nutr*, 2025, 155(2): 570-579.
- [23] BAO Y, WAN X, FU J, et al. The risk of venous thromboembolism in cancer patients receiving chemotherapy: a meta-analysis with systematic review[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(4): 277.
- [24] TANG F, LIU D, WAN F, et al. Ameliorative effect of anisodamine (654-1/654-2) against myocardial dysfunction induced by septic shock via the NF- κ B/NLRP-3 or the PI3K-AKT/NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155277.
- [25] LI J K, YAN J W, TU G W, et al. NRF1 coordinates mitochondrial adaptations to dampen intracellular ROS and inflammatory responses during ischemia reperfusion[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 236.
- [26] 吕梦姣, 杨毅, 田晓寒, 等. 低氧条件下 M2 型巨噬细胞外泌体对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响机制[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(5): 24-31.

(李科 编辑)

本文引用格式: 靳鑫, 熊显委, 陈施羽, 等. 氢溴酸山莨菪碱对敌草快诱导的小鼠巨噬细胞的保护作用及其机制探讨[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(12): 34-42.

Cite this article as: JIN X, XIONG X W, CHEN S Y, et al. Effects and mechanisms of Ani-HBr on DQ-induced injury in murine macrophages[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(12): 34-42.