· 实验研究 ·

CELF/HS通过下调HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB信号通路抑制细胞焦亡对小鼠细菌性角膜炎的治疗作用及机制

王梦珂 刘康 王望 冯华阳 李佳珂 邓钰婷 李景果 栗占荣

郑州大学人民医院 河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科学与视觉科学重点实验室，郑州 450003

通信作者：栗占荣，Email：lizhanrong@zzu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨雷公藤红素呋咱衍生物/纳米胶束（CELF/HS）对金黄色葡萄球菌（SA）诱导小鼠细菌性角膜炎的治疗作用，及其对己糖激酶2（HK2）/NOD样受体蛋白3（NLRP3）、受体相互作用蛋白激酶2（RIPK2）/核因子κB（NF-κB）信号通路和巨噬细胞焦亡的影响。 **方法** 合成CELF，制备CELF/HS并对其进行表征，评估CELF/HS细胞安全性，采用最低抑菌浓度（MIC）测定、细菌生长曲线、平板菌落计数、扫描电子显微镜和活/死菌染色评价CELF/HS的体外抗菌活性。将RAW264.7巨噬细胞分为对照组、肽聚糖组、空白载体组和CELF/HS组，采用免疫荧光染色检测各组细胞中HK2、RIPK2、NLRP3、含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白（ASC）、胱天蛋白酶-1（Caspase-1）、Gasdermin D氨基末端结构域（N-GSDMD）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、IL-1β、IL-18、NF-κB p65等蛋白表达情况。选取6~8周龄雌性SPF级C57BL/6小鼠30只，其中24只建立SA诱导细菌性角膜炎模型，采用随机数字表法分为模型对照组、空白载体组（HS，125 μg/ml，每日3次）、妥布霉素组和CELF/HS组（CELF/HS，6.25 μg/ml，每日3次），每组6只；另6只作为正常对照组。造模1 d后开始点眼，于造模后第1、3、5和7天进行裂隙灯显微镜检查和角膜荧光素钠染色；第7天通过菌落形成单位（CFU）计数评价角膜细菌负荷；取第7天角膜组织行苏木精-伊红染色和免疫荧光染色，检测角膜组织中TNF-α、IL-6、IL-1β、N-GSDMD表达。 **结果** 体外平板实验示CELF/HS（6.25 μg/ml）孵育8 h，可有效抑制细菌生长，扫描电子显微镜及活/死菌染色显示CELF/HS（6.25 μg/ml）可有效杀灭SA。与肽聚糖组相比，CELF/HS组RAW264.7细胞RIPK2/NF-κB信号通路相关蛋白（P-RIPK2、RIPK2、P-NF-κB p65、NF-κB p65）、HK2/NLRP3信号轴相关蛋白（HK2、NLRP3、ASC、Caspase-1）、细胞焦亡相关蛋白（GSDMD、N-GSDMD）、炎症因子（IL-6、TNF-α、IL-1β及IL-18）荧光强度均显著降低，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。随观察时间延长，CELF/HS组角膜混浊、水肿及荧光素钠染色面积逐渐减轻，第7天角膜透明度明显改善。造模后第3、5和7天，CELF/HS组角膜荧光素钠染色面积均低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。第7天感染角膜组织再培养结果显示，模型对照组、空白载体组、妥布霉素组、CELF/HS组菌落计数分别为（11 170±245）、（11 047±925）、（6 567±404）、（58.33±15.28）CFU，各组菌落计数总体比较差异有统计学意义（$F=297.60$，$P<0.001$），其中妥布霉素组菌落计数低于模型对照组和空白载体组，CELF/HS组菌落计数低于模型对照组、空白载体组及妥布霉素组，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。模型对照组和空白载体组角膜厚度均高于正常对照组、妥布霉素组、CELF/HS组，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。妥布霉素组炎症细胞数量低于模型对照组和空白载体组，CELF/HS组低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。CELF/HS组TNF-α、IL-6、IL-1β及N-GSDMD平均荧光强度均低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。 **结论** CELF/HS有效杀灭SA的同时可减轻角膜炎症，可能与其抑制HK2/NLRP3、RIPK2/NF-κB信号通路活化，减少NLRP3炎症小体形成及GSDMD介导的细胞焦亡有关。

【关键词】 雷公藤红素；呋咱衍生物；细菌性角膜炎；细胞焦亡；炎症小体

基金项目： 国家自然科学基金（82371108）；河南省科技研发计划联合基金（242301420010）；河南省“三个100”计划临床医学科学家培养专项（HNCMS202402）；河南省自然科学基金杰青项目（252300421024）

DOI：10.3760/cma.j.cn115989-20251007-00330

Therapeutic effect and mechanism of CELF/HS on bacterial keratitis in mice through inhibiting pyroptosis by downregulating the HK2/NLRP3 and RIPK2/NF-κB signaling pathways

Wang Mengke, Liu Kang, Wang Wang, Feng Huayang, Li Jiake, Deng Yuting, Li Jingguo, Li Zhanrong

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

People's Hospital of Zhengzhou University, Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Zhengzhou 450003, China
Corresponding author: Li Zhanrong, Email: lizhanrong@zzu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects of the celastrol-furoxan derivative-loaded nanomicelles (CELF/HS) on *Staphylococcus aureus* (SA)-induced bacterial keratitis in mice and its effects on the hexokinase 2 (HK2)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and receptor-interacting protein kinase 2 (RIPK2)/nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathways and macrophage pyroptosis. **Methods** CELF was synthesized, and CELF/HS were prepared and characterized. The cytocompatibility of CELF/HS was evaluated. Its *in vitro* antibacterial activity was assessed by minimum inhibitory concentration (MIC) determination, bacterial growth curves, plate colony counting, scanning electron microscopy, and live/dead bacterial staining. RAW264.7 macrophages were divided into the control, peptidoglycan (PGN), blank vector, and CELF/HS groups. The expression of HK2, RIPK2, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), caspase-1, N-terminal gasdermin D (N-GSDMD), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-6, IL-1β, IL-18, and NF-κB p65, as well as other related proteins was detected by immunofluorescence staining. Thirty female specific pathogen-free C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were selected. Bacterial keratitis was induced by SA in 24 mice, which were randomly assigned to the model control group, blank vector group (HS, 125 μg/ml, three times daily), tobramycin group, and CELF/HS group (CELF/HS, 6.25 μg/ml, three times daily) using a random number table, with 6 mice in each group. The remaining 6 mice served as the normal control group. Eye-drop treatment was initiated 1 day after model establishment. Slit-lamp microscopy and corneal fluorescein sodium staining were performed on days 1, 3, 5, and 7 after modeling. On day 7, corneal bacterial burden was evaluated by colony-forming unit (CFU) counting. Corneal tissues were collected for hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence staining to detect TNF-α, IL-6, IL-1β, and N-GSDMD expression. All animal procedures were reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECA-2025-10). **Results** The *in vitro* plate assay showed that CELF/HS at 6.25 μg/ml effectively inhibited bacterial growth after 8 hours of incubation. Scanning electron microscopy and live/dead bacterial staining further demonstrated that CELF/HS at 6.25 μg/ml effectively killed SA. Compared with the PGN group, the CELF/HS group showed significantly lower fluorescence intensities of RIPK2/NF-κB signaling pathway-related proteins (P-RIPK2, RIPK2, P-NF-κB p65, and NF-κB p65), HK2/NLRP3 signaling axis-related proteins (HK2, NLRP3, ASC, and caspase-1), pyroptosis-related proteins (GSDMD and N-GSDMD), and inflammatory cytokines (IL-6, TNF-α, IL-1β, and IL-18) in RAW264.7 cells, with statistically significant differences (all $P<0.05$). With increasing observation time, corneal opacity, edema, and fluorescein sodium-stained area gradually decreased in the CELF/HS group, with marked improvement in corneal transparency on day 7. On days 3, 5, and 7 after model establishment, the corneal fluorescein sodium-stained area in the CELF/HS group was significantly smaller than those in the model control, blank vector, and tobramycin groups (all $P<0.05$). On day 7, the colony counts of re-cultured infected corneal tissues were (11 170±245), (11 047±925), (6 567±404), and (58.33±15.28) CFU in the model control, blank vector, tobramycin, and CELF/HS groups, respectively, with a significant overall difference ($F=297.60$, $P<0.001$). Colony counts were significantly lower in the tobramycin group than in the model control and blank vector groups, and were significantly lower in the CELF/HS group than in the model control, blank vector, and tobramycin groups (all $P<0.05$). Corneal thickness was significantly greater in the model control and blank vector groups than in the normal control, tobramycin, and CELF/HS groups (all $P<0.05$). The number of inflammatory cells was significantly lower in the tobramycin group than in the model control and blank vector groups, and was significantly lower in the CELF/HS group than in the model control, blank vector, and tobramycin groups (all $P<0.05$). The mean fluorescence intensities of TNF-α, IL-6, IL-1β, and N-GSDMD in corneal tissues were significantly lower in the CELF/HS group than in the model control, blank vector, and tobramycin groups (all $P<0.05$). **Conclusions** CELF/HS effectively kills SA while alleviating corneal inflammation. Its therapeutic effects may be associated with the inhibition of the HK2/NLRP3 and RIPK2/NF-κB signaling pathways, reduction of NLRP3 inflammasome formation, and suppression of GSDMD-mediated pyroptosis.

[Key words] Celastrol; Furoxan derivative; Bacterial keratitis; Pyroptosis; Inflammasome

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82371108); Henan Provincial Science and Technology Research and Development Program Joint Fund (242301420010); Clinical Medical Scientist Training Program under the "Three 100" Initiative of Henan Province (HNCMS202402); The Jieqing Program of Natural Science Foundation of Henan Province (252300421024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20251007-00330

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

细菌性角膜炎是常见的致盲性感染性眼病，常见诱因包括长时间佩戴角膜接触镜、角膜创伤和免疫抑制，全球年发病达200~350万例[1]。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，SA）是其主要致病菌之一，占细菌性角膜炎病例的8%~36%[2]。SA感染角膜引起大量炎症细胞浸润和炎症因子释放，导致角膜组织严重破坏，形成角膜溃疡甚至穿孔，最终引发不可逆性视功能损伤[3]。随着抗生素耐药性问题日益严重，细菌性角膜炎的临床治疗面临巨大挑战[4]。目前临床主要使用抗生素控制感染，但对于严重炎症反应的干预手段有限，因此深入研究细菌性角膜炎的机制，探寻兼具杀菌和抗炎功能的药物，对细菌性角膜炎继发角膜盲的治疗具有重要的临床意义。

细胞焦亡是Gasdermin（GSDM）蛋白家族介导的程序性细胞死亡，其核心机制为GSDM蛋白家族的激活和膜孔形成，导致质膜破坏和细胞内容物释放，伴随强烈的促炎效应。焦亡是机体应对病原体感染的重要细胞死亡方式，可由经典的炎症小体通路和细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）活化的非经典炎症小体通路激活GSDMD，拮抗和清除病原菌感染[5]。各类感染性疾病常伴随焦亡的异常激活。在细菌感染中，巨噬细胞作为重要的效应细胞，发生细胞焦亡时可通过释放大量炎性因子，加剧组织损伤[6]。GSDMD蛋白经酶切形成的N端结构域（N-GSDMD）具有膜成孔活性，是焦亡的执行者，可释放细胞内容物和促炎介质，包括白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）和IL-18。经典的炎症小体激活途径中，炎症小体是响应病原体相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns，PAMPs）或损伤相关分子模式（damage-associated molecular patterns，DAMPs）后组装形成的胞质免疫信号复合物，通常包括感受器、适配器含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD/domain，ASC）和胱天蛋白酶-1（Caspase-1）。PAMPs包括聚糖和糖结合物，如细菌LPS（革兰阴性菌细胞膜上的内毒素）和肽聚糖（革兰阳性菌细胞壁成分）等，可刺激炎症小体形成[7]。

受体相互作用蛋白激酶2（receptor-interacting protein kinase 2，RIPK2）是模式识别受体，如核苷酸结合寡聚化结构域蛋白1/2（nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2，NOD1/2）的下游信号分子，当细菌肽聚糖等PAMPs被NOD1或NOD2识别后，RIPK2被招募并磷酸化，激活下游的转化生长因子β激活激酶1（transforming growth factor-β-activated kinase 1，TAK1）/核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路，诱导炎症因子，如IL-1β、IL-6、NOD样受体蛋白3（NOD-like receptor protein 3，NLRP3）等的转录和分泌，从而启动先天免疫反应[8]。因此，下调RIPK2/NF-κB信号通路可能抑制SA角膜炎的炎症反应。研究发现，己糖激酶2（hexokinase 2，HK2）从线粒体表面释放是NLRP3炎症小体组装和激活的关键环节，尽管驱动这种释放的机制可能不同[9]。在革兰阳性细菌感染时，肽聚糖在溶酶体中被降解，释放出N-乙酰氨基葡萄糖（N-acetylglucosamine，NAG），NAG可抑制HK2的酶活性，导致HK2从线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道（voltage-dependent anion channel，VDAC）解离，进入细胞质。组装的炎症小体还可水解pro-IL-1β和pro-IL-18为活化的IL-1β和IL-18。N-GSDMD形成的跨膜孔导致细胞肿胀、细胞破裂，释放包括IL-1β和IL-18在内的细胞内容物，放大炎症反应[10]。因此，有效干预HK2/NLRP3轴将有效抑制感染性角膜炎症。

雷公藤红素（celastrol，CEL）是从卫矛科植物雷公藤根皮中提取的五环三萜类中药单体，具有天然抗炎、抗肿瘤及免疫调节等多种药理活性[11]。CEL还具有抗菌作用，如SA、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肠球菌、痤疮丙酸杆菌、致龋菌和枯草芽孢杆菌等[12]。研究表明，CEL通过ROS/NF-κB/NLRP3炎症小体轴抑制类风湿性关节炎[13]。然而，CEL是否通过调控细胞焦亡影响细菌性角膜炎的进程尚不清楚。

理化性质稳定的呋咱氮氧化物是一类结构中含有1，2，5-恶二唑-2-氧化物的一氧化氮（nitric oxide，NO）供体，可被含巯基的分子还原，释放NO[14]。NO是一种重要的生物信号分子，可清除氧自由基并抑制NF-κB活性，发挥抗炎作用，在炎症相关疾病的治疗中具有潜在应用价值[15]。本研究以呋咱氮氧化物为NO供体，通过酰胺缩合反应将其与CEL的羧基定向偶联，构建雷公藤红素-呋咱衍生物（celastrol-furoxan derivative，CELF），以通过NO的协同作用，提升母体CEL化合物的抗炎效能。

尽管CEL具有治疗细菌性角膜炎的潜力，但水溶性差，限制了其进一步应用，拟合成的CELF并不改变其水溶性。纳米胶束策略可增强药物表观溶解度，为药物研发和临床治疗提供了全新技术思路。15-羟基硬脂酸聚乙二醇（Kolliphor® HS 15，HS）为国家药品监督管理局批准、可用于注射剂的增溶剂，具有安全性好、增溶能力突出和热稳定性好的优势。本研究拟采用HS负载CELF，以提高其溶解度。通过建立SA诱导的小鼠细菌性角膜炎模型，探讨CELF对SA角膜炎的治疗效

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

果，进一步评估其是否通过调控HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB信号通路影响细胞焦亡，从而减轻角膜炎症反应，以期为细菌性角膜炎的治疗提供新思路。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞和实验动物　大鼠结膜上皮细胞（rPCEC）购自上海赛百慷生物技术股份有限公司；人角膜上皮细胞（HCE-2）购自美国典型培养物保藏中心；小鼠巨噬细胞（RAW264.7）购自上海中乔新舟生物科技有限公司。选取6~8周龄雌性SPF级C57BL/6小鼠30只，购自辽宁长生生物技术股份有限公司[生产许可证号：SCXK（辽）2020-0001]。饲养条件符合医学实验动物饲养要求，饲养环境为SPF级，温度为（22±2）℃，相对湿度为50%~60%，12 h昼夜节律，动物自由摄食、饮水。实验动物的使用和处理均遵循视觉与眼科研究协会关于眼科和视觉研究中动物使用的声明。本研究方案经河南省立眼科医院实验动物伦理委员会审查批准（批文号：HNEECA-2025-10）。

1.1.2　主要试剂及仪器　CELF由本实验室合成，纯度>98%；SA菌株（ATCC 25923，美国菌种保藏中心）；DMEM/F12培养基、10% Gibco血清、1%青霉素-链霉素溶液（美国Gibco公司）；rPCEC培养基（上海赛百慷生物技术股份有限公司）；巨噬细胞培养基（上海中乔新舟生物科技有限公司）；胰蛋白胨肉汤（tryptic soy broth，TSB）（北京索莱宝科技有限公司）；胰蛋白胨大豆琼脂（tryptic soy agar，TSA）平板（美国Sigma-Aldrich公司）；兔抗肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α TNF-α）、IL-6、IL-18、GSDMD、NF-κB p65、P-NF-κB p65、RIPK2、P-RIPK2抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司）；兔抗IL-1β、NLRP3、Caspase-1、HK2抗体（北京博奥森生物技术有限公司）；鼠抗ASC抗体（上海圣克鲁斯生物技术有限公司）；兔抗N-GSDMD抗体（南京赛戈巍生物科技有限公司）；肽聚糖（上海麦克林生化科技有限公司）；FAS眼球固定液（武汉赛维尔生物科技有限公司）；细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）（上海东庚化工技术有限公司）；活死细菌双染试剂盒（美国Invitrogen公司）。AV-400核磁共振波谱仪（瑞士Bruker公司）；solariX高分辨率质谱仪（德国Barker公司）；Cytation5酶标记仪（美国Biotek公司）；扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）（德国ZEISS公司）；免疫荧光显微镜（日本Nikon公司）；光学显微镜（日本Olympus公司）；凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司）；Zetasizer Nano ZS（英国马尔文帕纳利巴特公司）。

1.2　方法

1.2.1　CELF合成及CELF/HS的制备与表征　（1）CELF合成　将苯硫基乙酸13.4 g溶解于45 ml冰醋酸中，加入过氧化氢水溶液16.2 ml，室温搅拌3 h，缓慢滴加发烟硝酸32 ml，100 ℃反应4 h。结束后加冰至白色固体析出，抽滤得到中间体1。四氢呋喃（tetrahydrofuran，THF）4 ml溶解中间体1，加入N-Boc-乙醇胺（3.0 eq）和50% NaOH水溶液（1 ml，3.0 eq），调pH为中性，乙酸乙酯（ethyl acetate，EtOAc）萃取水相，无水硫酸钠干燥，蒸干，柱层析纯化得到白色固体；二氯甲烷（dichloromethane，DCM）溶解后冰浴20 min，加入氯化氢乙酸乙酯溶液（HCL/EtOAc）脱去Boc基。反应结束后，旋干溶剂，用饱和碳酸氢钠水溶液调pH为碱性后再用EtOAc萃取3次，有机相用无水硫酸钠干燥，蒸干，得到中间体2。DCM 2 ml溶解中间体2（0.05 mmol，1.0 eq），依次加入CEL（1.1 eq）、[1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，1-ethyl-3-（3-dimethylaminopropyl） carbodiimide hydrochloride，EDCI]（1.2 eq）、1-羟基苯并三唑（1-hydroxybenzotriazole，HOBt）（1.2 eq）和N，N-二异丙基乙胺（N，N-diisopropylethylamine，DIPEA）（1.2 eq），室温反应1 h，DCM稀释反应体系，有机相用饱和氯化铵溶液洗3次，用无水硫酸钠干燥，蒸干，柱色谱纯化，得到终产物CELF（图1）。采用AV-400核磁共振波谱仪测定CELF的^{1}H和^{13}C核磁谱。solariX质谱仪（ESI离子源）测定CELF的高分辨质谱。（2）CELF/HS的制备与表征　20 mg CELF和400 mg HS混合后充分溶解在5 ml二甲基亚砜中，随后在超声条件下缓慢滴加到20 ml去离子水中，将溶液转移到透析袋中，在大量去离子水中透析48 h，得到载CELF纳米胶束（CELF/HS）。载药纳米胶束溶液于-80 ℃超低温冰箱中预冷冻至完全固化，转移到冷冻干燥机中完全干燥，-20 ℃存储备用。使用上述相同方法制备空白载体HS的对照样品，但不添加药物。^{1}H核磁共振谱和^{13}C核磁共振谱在AV-400核磁共振波谱仪用于表征CELF基团。通过动态光散射（dynamic light scattering，DLS）测定空白载体及CELF/HS粒径。

1.2.2　细胞培养及CELF/HS细胞安全性评估　rPCEC和HCE-2细胞均在37 ℃、含5% CO_2的培养箱中培养，并参照文献[16]中确立的方案进行传代。将rPCEC和HCE-2细胞以每孔1×10^4个细胞接种到96孔板中，每孔含100 μl完全培养基。分别采用0、1、2、3、4、5、6、7和8 μmol/L CELF/HS作用于细胞24 h，在每个孔

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

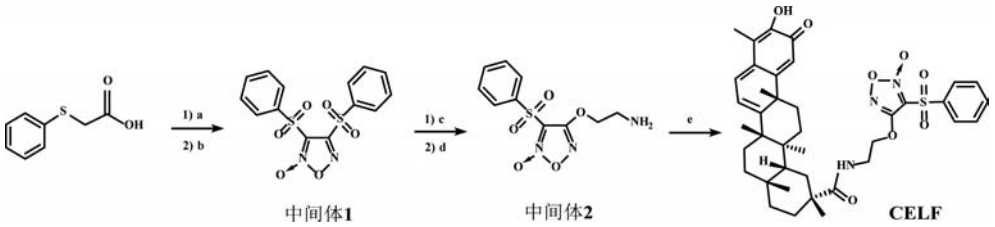


图1 CELF合成步骤 a：30% H_2O_2+冰醋酸，室温3 h；b：发烟硝酸+冰醋酸，100 ℃ 4 h；c：N-Boc-乙醇胺，NaOH水溶液+THF，室温1 h；d：HCl/EtOAc+DCM，室温3 h；e：EDCI+HOBt+DIPEA+DCM，室温1 h CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物；THF：四氢呋喃；EtOAc：乙酸乙酯；DCM：二氯甲烷；EDCI：1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐；HOBt：1-羟基苯并三唑；DIPEA：N，N-二异丙基乙胺

Figure 1 Synthesis of CELF a: 30% H_2O_2, glacial acetic acid, room temperature, 3 hours; b: fuming HNO3, glacial acetic acid, 100 °C, 4 hours; c: N-Boc-ethanolamine, NaOH (aq), THF, room temperature, 1 hour; d: HCl/EtOAc, DCM, room temperature, 3 hours; e: EDCI, HOBt, DIPEA, DCM, room temperature, 1 hour CELF: celastrol-furoxan derivative; THF: tetrahydrofuran; EtOAc: ethyl acetate; DCM: dichloromethane; EDCI: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; HOBt: 1-hydroxybenzotriazole; DIPEA: N, N-diisopropylethylamine

中加入10% CCK-8溶液，避光孵育4 h后使用Cytation5酶标记仪测量450 nm处吸光度(absorbance，*A*)，计算细胞活力值。

1.2.3 体外抗菌活性评估 (1)最低抑菌浓度测定 将冻存的SA菌株划线接种于TSA平板，置于37 ℃培养箱中培养18~24 h进行复苏；液体培养体系采用TSB培养基，菌液置于37 ℃摇床振荡扩增培养；取扩增后菌液，接种到含TSB培养基的96孔板中，使A_{600}达到0.1；将CELF/HS在TSB培养基中稀释，以获得0.039~10 μg/ml的最终浓度；将培养板在37 ℃下培养12 h，记录A_{600}值，测定CELF/HS的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration，MIC)。(2)细菌生长曲线 将A_{600}达0.1的细菌悬液与CELF/HS(6.25 μg/ml)在37 ℃下共培养，以无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution，PBS)作为对照，在共培养第0、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h测定A_{600}，并绘制生长曲线。(3)平板菌落计数量化CELF/HS的抗菌效果 采用平板计数法，将SA与CELF/HS(6.25 μg/mL)于37 ℃共培养，分别于0、1、2、4、6和8 h收集细菌悬液，经适当梯度稀释后涂布于TSA平板，于37 ℃培养后计数菌落形成单位(colony-forming unit，CFU)。以0 h菌落数为基准，计算各时间点的相对细菌存活率，相对细菌存活率(%)=各时间点菌落数/0 h菌落数×100%。(4)SEM观察 将细菌悬液与CELF/HS(6.25 μg/ml)在37 ℃下共培养6 h，以PBS作为对照；收集细菌沉淀后依次经离心分离、戊二醛固定、PBS漂洗、梯度乙醇脱水、干燥、离子溅射喷金处理，处理完成后采用SEM进行形态观察与图像采集。(5)活/死菌染色 采用相同条件共培养6 h后，离心收集细菌沉淀，使用活死细菌双染试剂盒中的SYTO 9和碘化丙啶(propidium iodide，PI)染色15 min，用PBS漂洗3次；使用免疫荧光显微镜观察细菌荧光形态，采用ImageJ软件定量分析荧光信号强度。

1.2.4 免疫荧光染色检测HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB信号通路相关蛋白及炎症因子表达情况 将RAW264.7细胞分为对照组、肽聚糖组、空白载体组、CELF/HS组，以每孔5 000个细胞的密度接种在6孔板上，空白载体组和CELF/HS组分别用空白载体(10 μg/ml)和CELF/HS(0.5 μg/ml)预处理细胞8 h，肽聚糖组、空白载体组和CELF/HS组使用肽聚糖(20 μg/ml)刺激细胞12 h，对照组不做处理。各组处理完成后用4%多聚甲醛固定15 min，用PBS洗涤细胞3次；用0.5% Triton X-100孵育细胞10 min实现膜通透性，再用PBS洗涤；用山羊血清封闭细胞30 min；加一抗RIPK2(1∶100)和P-RIPK2、NF-κB p65、P-NF-κB p65、NLRP3、Caspase-1、ASC、HK2、GSDMD、N-GSDMD、IL-6、IL-1β、TNF-α、IL-18(均1∶200稀释)，4 ℃孵育过夜；用PBS洗涤后，在室温下用荧光二抗孵育细胞1 h；细胞核用4′，6-二脒基-2-苯基吲哚复染。采用100×油浸物镜进行图像采集，在相同显微镜参数下，每孔随机选取若干个非重叠视野进行拍摄，并使用ImageJ软件测定目标蛋白的平均荧光强度。

1.2.5 细菌性角膜炎动物模型建立与分组 小鼠腹腔注射5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)诱导全身麻醉，碘伏消毒术眼眼周，手术显微镜下用直径2 mm环钻在小鼠角膜中央压痕，以定位感染角膜病灶范围，45°角膜刀去除标记部位角膜上皮并刮伤浅层角膜基质，将备好的SA菌液(5 μl，10^8 CFU/ml)接种至角膜创面。采用随机数字表法将建模的24只小鼠分为模型对照组、空白载体组、妥布霉素组、CELF/HS组，每组6只。造模后24 h，模型对照组、空白载体组、妥布霉素组、CELF/HS组分别给予5 μl生理盐水、空白载体(125 μg/ml)、妥布霉素(6.25 μg/ml)、CELF/HS(6.25 μg/ml)点眼，均每天3次，连续7 d。剩余6只小鼠作为正常对照，不做特殊处理。

1.2.6 各组小鼠临床评分及取材 建模后每隔1 d裂隙灯显微镜下观察并进行眼前段数码照相，记录角膜情况并参照文献[17-18]进行临床评分，采用ImageJ软件评估各组角膜荧光素钠染色面积。第7天实验结

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

束后，采用过量戊巴比妥钠腹腔注射处死小鼠。根据实验目的，将各组小鼠随机分配用于不同检测。每组取3只小鼠，摘取感染眼球，在无菌条件下分离角膜组织，经组织匀浆后接种于TSA平板进行细菌培养，并通过CFU计数评价角膜细菌负荷。另取每组3只小鼠感染眼球，经FAS眼球固定液固定后，用于苏木精-伊红染色及免疫荧光染色等组织病理学分析。

1.2.7 各组小鼠角膜组织病理学评估　(1)苏木精-伊红染色　将眼球组织的石蜡切片依次浸入二甲苯、无水乙醇及75%乙醇中进行脱蜡处理，用PBS漂洗3次，每次5 min。切片经苏木素染液浸染后，用分化液进行分化处理，以去除多余染色。将切片置于梯度乙醇中脱水后，浸入伊红染液中进行复染。染色后的切片依次经无水乙醇、二甲苯脱水至透明，最后以中性树胶封片保存。封片后的样本于通风橱中自然晾干，置于光学显微镜下观察组织形态，并随机选取视野采集图像进行分析，以观察各组角膜情况。(2)免疫荧光染色　石蜡切片脱蜡水化处理，将组织切片浸入盛有柠檬酸抗原修复缓冲液的容器中，置于微波炉内加热进行抗原修复。修复完毕后，待切片自然冷却至室温，用PBS漂洗3次，每次5 min；滴加3% BSA封闭液，室温孵育30 min以阻断非特异性结合位点；吸弃封闭液，每张切片滴加200 μl按1∶200稀释的一抗工作液，一抗工作液包括TNF-α、IL-6、IL-1β和N-GSDMD，置于湿盒内4 ℃孵育过夜；PBS漂洗3次，每次5 min。每张切片滴加200 μl与一抗种属来源对应的荧光标记二抗，室温避光孵育30 min，PBS漂洗3次，每次5 min；滴加DAPI染液，室温避光孵育10 min，PBS漂洗3次，每次5 min；滴加组织自发荧光淬灭剂，室温避光处理5 min；随后以流水冲洗10 min；滴加抗荧光淬灭封片剂，加盖玻片封固。封片后的样本于荧光显微镜下观察，随机选取视野采集图像并进行分析，以评价炎症反应。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验证实呈正态分布者以$\bar{x}\pm s$表示，各组各指标总体比较采用单因素方差分析，菌落计数资料组间两两比较采用Tukey检验，其余计量资料组间两两比较采用LSD-t检验。不符合正态分布者以$M(Q_1, Q_3)$表示，各组各指标总体比较采用Kruskal-Wallis检验，组间两两比较采用Dunn检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CELF结构表征及CELF/HS粒径、生物安全性和体外抗菌活性

制备的CELF为红色固体，产率为61%。高分辨质谱检测显示，CELF的钠离子加合峰m/z为740.297 0 [M+Na]$^+$，与$C_{39}H_{47}N_3NaO_8S$的理论计算值740.297 6基本一致。^{1}H-NMR结果显示，δ 8.05～6.35 ppm范围内出现芳香质子和烯烃质子的特征信号，δ 2.75～0.94 ppm范围内出现CEL骨架来源的甲基和亚甲基质子信号；^{13}C-NMR共检测到39个碳信号，其中δ 174.36、172.90和169.03 ppm处可见羰基碳特征信号。空白载体和CELF/HS平均粒径分别为(14.21±0.31)和(9.23±0.15)nm。

CCK-8检测结果显示，0、1、2、3、4、5、6、7和8 μmol/L CELF/HS处理HCE-2后，细胞活力值分别为(100.03±1.53)%、(110.42±1.67)%、(101.99±7.25)%、(106.44±2.21)%、(103.72±0.30)%、(105.68±3.49)%、(101.73±7.67)%、(102.62±0.21)%和(73.01±33.08)%，rPCEC细胞活力值分别为(100.00±4.39)%、(111.00±7.12)%、(98.51±2.13)%、(97.90±3.99)%、(90.77±3.26)%、(90.03±5.34)%、(90.51±6.51)%、(72.73±9.30)%和(79.62±8.72)%。0～7 μmol/L CELF/HS处理后HCE-2细胞活力总体维持在较高水平，8 μmol/L时细胞活力下降；0～6 μmol/L CELF/HS处理后rPCEC细胞活力总体维持在较高水平，7～8 μmol/L时有所下降(图2A、B)。结果提示，CELF/HS在较低浓度范围内对角膜上皮细胞和结膜上皮细胞具有较好的生物相容性。

CELF/HS对SA菌株的MIC为1.25 μg/ml。与对照组相比，CELF/HS组在6.25 μg/ml浓度下完全抑制细菌生长，在整个监测期间，A_{600}值保持恒定(图2C)。生长抑制实验中，在6.25 μg/ml浓度下暴露2 h后，SA菌落数显著减少，8 h后未见菌落生长(图2D、E)。

SEM结果显示，对照组SA表面光滑、形态完整，球状结构保持完好。CELF/HS组SA表面皱缩、凹陷、破裂、内容物渗漏，甚至细胞完全裂解成碎片(图2F)。活/死菌荧光染色显示，对照组SA以SYTO 9绿色荧光为主、PI红色荧光较少；CELF/HS组绿色荧光减少，红色荧光明显增多(图2G)。

2.2 各组RAW264.7细胞RIPK2/NF-κB信号通路相关蛋白表达比较

各组RAW264.7细胞中RIPK2、P-RIPK2、NF-κB p65及P-NF-κB p65平均荧光强度总体比较差异均有统计学意义(F=80.42、276.47、337.40、136.70，均$P<0.001$)，其中与肽聚糖组相比，CELF/HS组RIPK2、P-RIPK2、NF-κB p65和P-NF-κB p65荧光强度均显著降低，差异均有统计学意义(均$P<0.05$)(图3，表1)。

2.3 各组RAW264.7细胞中HK2/NLRP3信号轴相关

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

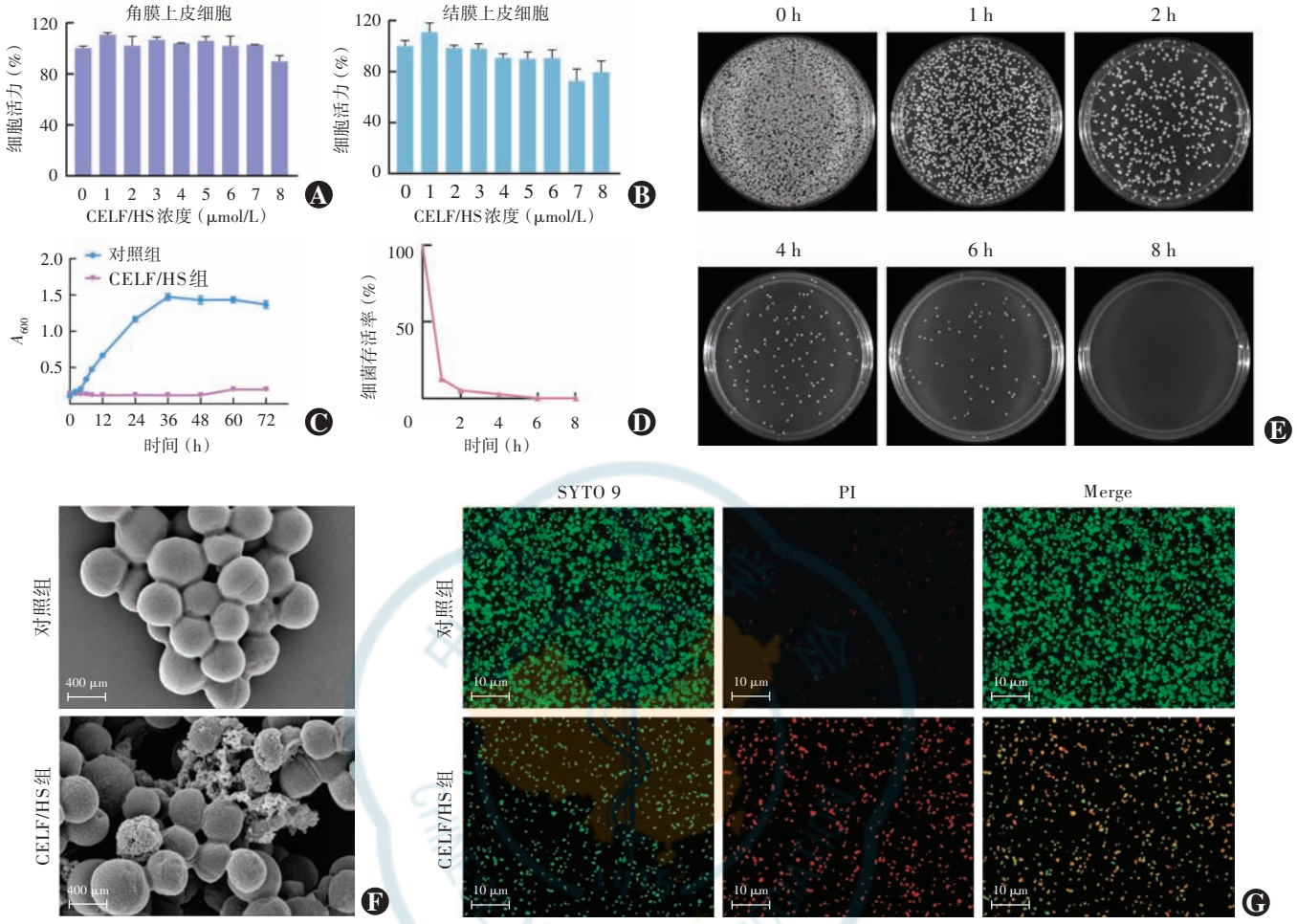


图2 CELF/HS的体外生物安全性及体外抗菌活性评估 A、B：不同浓度CELF/HS对角膜上皮细胞及结膜上皮细胞的生物安全性 C：不同处理条件下SA生长曲线 D：共培养不同时间SA存活率变化 E：细菌平板计数法评估CELF/HS（6.25 μg/ml）处理不同时间的抗菌效果 F：不同处理条件下SA扫描电子显微镜图片（标尺=400 nm） G：不同处理条件下活/死菌染色免疫荧光染色图片（标尺=10 μm） CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物；SA：金黄色葡萄球菌

Figure 2 Biological safety and antibacterial activity of CELF/HS *in vitro* A, B: The biological safety of different concentrations of CELF/HS on corneal epithelial cells and conjunctival epithelial cells C: Crowth curve of SA with different treatments D: SA survival ratio changes at different time points of co-culture E: The antibacterial effect of CELF/HS treated at different time points by bacterial plate counting assay F: Electron microscopy images of SA with different treatments (scale bar=400 nm) G: Fluorescent live/dead images of SA with different treatments (scale bar=10 μm) CELF: celastrol-furoxan derivatives; SA: *Staphylococcus aureus*

蛋白表达比较

各组RAW264.7细胞中HK2、NLRP3、ASC及Caspase-1平均荧光强度总体比较差异均有统计学意义（F=37.17、24.00、31.31、135.70，均P<0.001），其中与肽聚糖组相比，CELF/HS组HK2、NLRP3、ASC及Caspase-1荧光强度均显著降低，差异均有统计学意义（均P<0.05）（图4，表1）。

各组RAW264.7细胞中GSDMD和N-GSDMD平均荧光强度总体比较差异均有统计学意义（F=103.50、206.80，均P<0.001），其中与肽聚糖组相比，CELF/HS组GSDMD和N-GSDMD荧光强度均明显降低，差异均有统计学意义（均P<0.05）（图5，表1）。

各组RAW264.7细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β及IL-18平均荧光强度总体比较差异均有统计学意义（F=46.28、116.50、162.70、76.55，均P<0.001），其中与肽聚糖组相比，CELF/HS组IL-6、TNF-α、IL-1β及IL-18平均荧光强度均显著降低，差异均有统计学意义（均P<0.05）（图6，表2）。

2.4 各组小鼠细菌性角膜炎的体内治疗效果及角膜组织学评估

裂隙灯显微镜观察结果显示，造模后第1天，各组小鼠均可见明显角膜混浊、水肿及上皮缺损。随观察时间延长，CELF/HS组角膜混浊、水肿及荧光素钠染色面积逐渐减轻，第7天角膜透明度明显改善；模型对照组和空白载体组仍可见不同程度角膜混浊、水肿及上皮缺损，妥布霉素组较模型对照组和空白载体组减轻（图

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

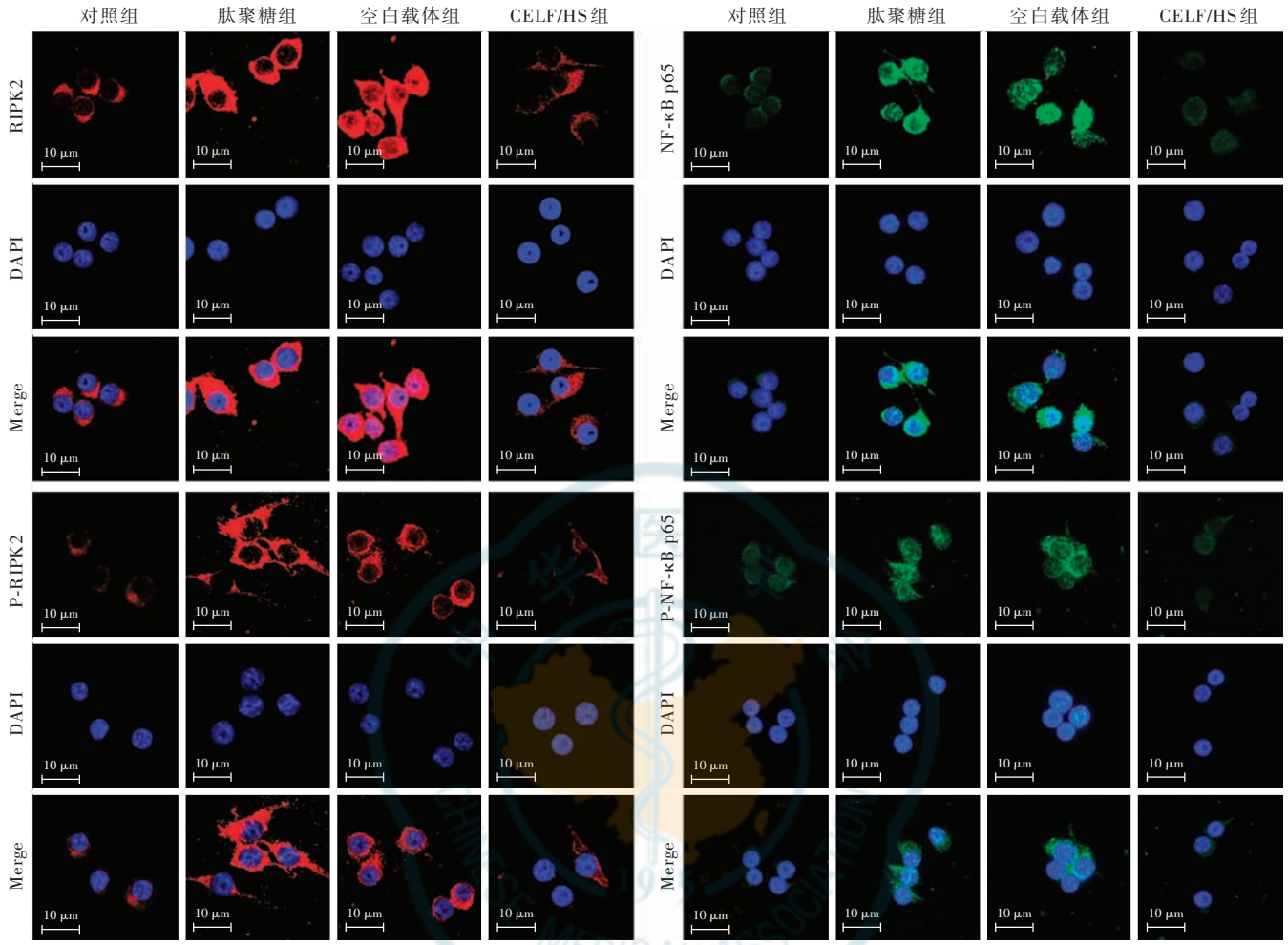


图3　各组RAW264.7细胞中RIPK2、P-RIPK2、NF-κB p65和P-NF-κB p65代表性免疫荧光染色图像（标尺=10 μm）　RIPK2：受体相互作用蛋白激酶2；P-RIPK2：磷酸化受体相互作用蛋白激酶2；NF-κB：核因子κB；P-NF-κB p65：磷酸化核因子κB p65；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Figure 3　Representative immunofluorescence staining images of RIPK2, P-RIPK2, NF-κB p65, and P-NF-κB p65 in RAW264.7 cells from different groups (scale bar=10 μm)　RIPK2: receptor-interacting protein kinase 2; P-RIPK2: phosphorylated receptor-interacting protein kinase 2; NF-κB: nuclear factor kappa B; P-NF-κB p65: phosphorylated nuclear factor kappa B p65; CELF: celastrol-furoxan derivative

7A、B）。各组造模后第1天角膜荧光素钠染色面积总体比较差异无统计学意义（F=0.26，P=0.854）；第3、5和7天各组间总体比较差异均有统计学意义（F=81.48、471.55、38.50，均P<0.001），其中CELF/HS组角膜荧光素钠染色面积均低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均P<0.05）（表3）。

造模后第3、5和7天各组角膜临床评分总体比较差异均有统计学意义（H=13.51、17.72、15.61，均P<0.05），其中第3天CELF/HS组角膜临床评分均低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均P<0.05）；第5天和第7天CELF/HS组角膜临床评分均低于模型对照组和空白载体组，差异均有统计学意义（均P<0.05）（表4）。

造模后第7天感染角膜组织再培养结果显示，模型对照组、空白载体组、妥布霉素组、CELF/HS组菌落计数分别为（11 170±245）、（11 047±925）、（6 567±404）、（58.33±15.28）CFU，各组菌落计数总体比较差异有统计学意义（F=297.60，P<0.001），其中妥布霉素组菌落计数低于模型对照组和空白载体组，CELF/HS组菌落计数低于模型对照组、空白载体组及妥布霉素组，差异均有统计学意义（均P<0.05）（图7C、D）。

苏木精-伊红染色结果显示，造模后第7天模型对照组和空白载体组角膜组织明显增厚，可见较多炎症细胞浸润；妥布霉素组角膜厚度及炎症细胞浸润较模型对照组和空白载体组减少；CELF/HS组角膜组织结构接近正常对照组，炎症细胞浸润明显减少（图8A）。各组角膜厚度总体比较差异有统计学意义（F=154.94，P<0.001），其中模型对照组和空白载体组角膜厚度均高于正常对照组、妥布霉素组、CELF/HS组，差异均有统计学意义（均P<0.05）；妥布霉素组、CELF/HS组和

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

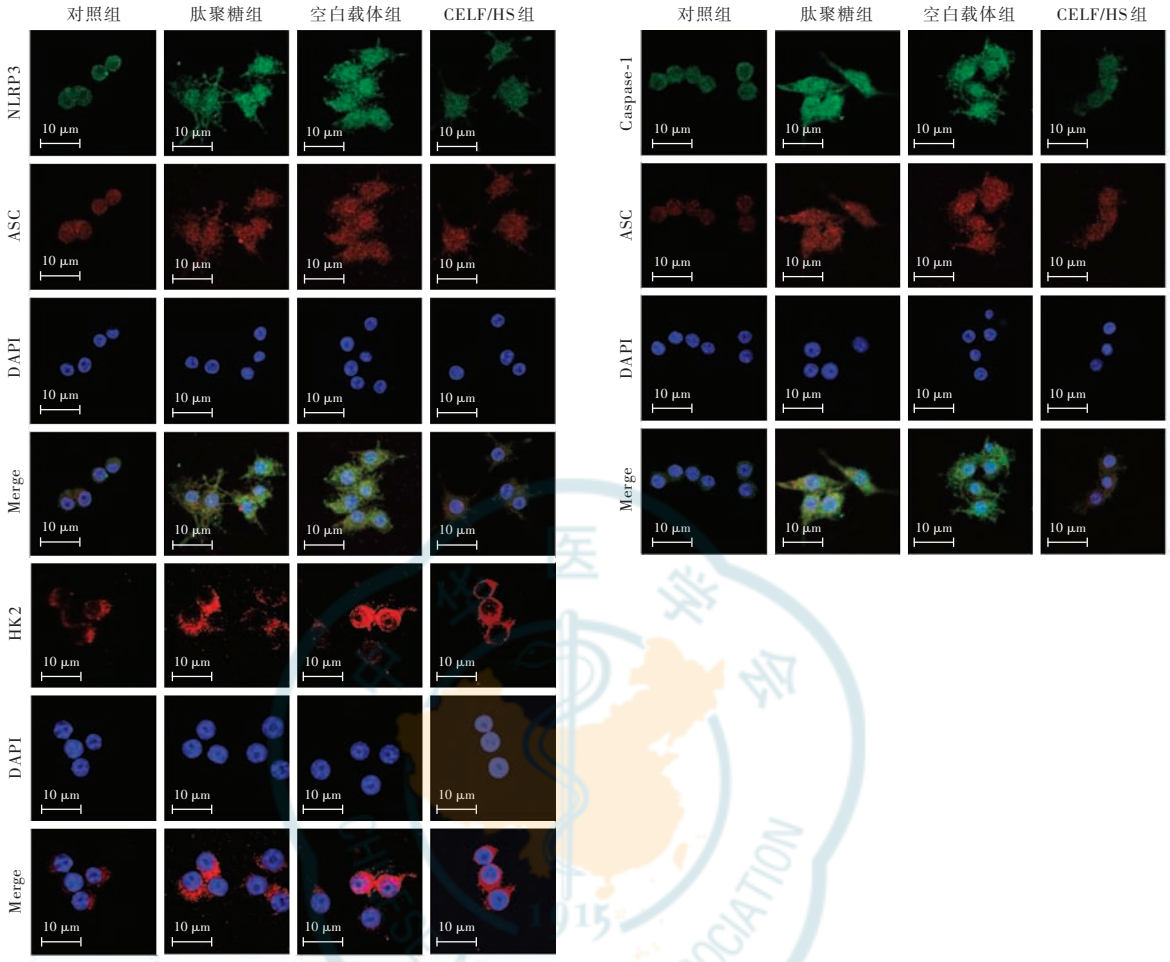


图4 各组RAW264.7细胞中NLRP3、ASC、Caspase-1和HK2的代表性免疫荧光染色图像（标尺=10 μm） NLRP3：NOD样受体蛋白3；ASC：含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1：胱天蛋白酶-1；HK2：己糖激酶2；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Figure 4 Representative immunofluorescence staining images of NLRP3, ASC, caspase-1, and HK2 in RAW264.7 cells from different groups (scale bar=10 μm) NLRP3: NOD-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; Caspase-1: cysteine-aspartic protease 1; HK2: hexokinase 2; CELF: celastrol-furoxan derivative

正常对照组间角膜厚度比较差异均无统计学意义（均P>0.05）。各组炎症细胞数量总体比较差异有统计学意义（F=229.98，P<0.001），其中妥布霉素组炎症细胞数量低于模型对照组和空白载体组，CELF/HS组低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均P<0.05）（表5）。

角膜组织免疫荧光染色结果显示，各组TNF-α、IL-6、IL-1β及N-GSDMD平均荧光强度总体比较差异均有统计学意义（F=46.81、70.11、249.00、335.00，均P<0.001），其中CELF/HS组TNF-α、IL-6、IL-1β及N-GSDMD平均荧光强度均低于模型对照组、空白载体组和妥布霉素组，差异均有统计学意义（均P<0.05）（图8B，表6）。

3 讨论

细菌性角膜炎是常见的致盲性感染性眼病，SA感染不仅可导致角膜组织细菌负荷增加，还可诱导过度炎症反应，引起角膜结构破坏和视功能损害。目前临床治疗主要依赖抗生素控制感染，但随着耐药性问题不断加剧，且单纯抗菌治疗难以有效控制感染相关炎症损伤，开发兼具抗菌和抗炎作用的新型治疗策略具有重要意义。本研究建立SA诱导的小鼠细菌性角膜炎模型，探讨CELF/HS的治疗效果及其潜在机制，结果显示，CELF/HS能够有效降低角膜组织细菌负荷，改善角膜混浊、水肿及炎症细胞浸润；同时，CELF/HS可抑制HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB相关信号激活，减少GSDMD介导的细胞焦亡及炎症因子释放，从而发挥抗菌和抗炎双重保护作用。

CEL是来源于雷公藤的一种天然五环三萜类化合物，具有抗炎、免疫调节及抗菌等多种生物学活性。然而，其较差的水溶性和潜在毒性限制了进一步应用。本研究通过引入呋咱氮氧化物NO供体基团构建

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

表1　各组RAW264.7细胞中RIPK2/NF-κB信号通路、HK2/NLRP3炎症小体及焦亡相关蛋白平均荧光强度比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 1　Comparison of mean fluorescence intensity of RIPK2/NF-κB signaling pathway, HK2/NLRP3 inflammasome, and pyroptosis-related proteins in RAW264.7 cells among different groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本量	RIPK2	P-RIPK2	NF-κB p65	P-NF-κB p65	HK2
对照组	3	149.95±8.69	114.39±5.70	26.74±6.16	27.89±2.03	89.36±6.86
肽聚糖组	3	224.35±4.48[a]	207.70±3.83[a]	159.37±7.65[a]	90.85±9.65[a]	163.79±14.63[a]
空白载体组	3	219.07±5.44[a]	185.25±12.67[a]	166.81±7.53[a]	100.69±5.15[a]	164.39±12.80[a]
CELF/HS组	3	169.84±8.68[bc]	134.04±9.42[bc]	37.32±7.17[bc]	25.62±4.13[bc]	109.74±6.76[bc]
*F*值		80.42	276.47	337.40	136.70	37.17
*P*值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
组别	样本量	NLRP3	ASC	Caspase-1	GSDMD	N-GSDMD
对照组	3	58.41±10.48	76.20±6.47	52.30±9.31	55.14±5.33	59.95±6.23
肽聚糖组	3	108.45±9.67[a]	153.05±22.02[a]	129.20±8.90[a]	123.70±5.01[a]	176.32±5.03[a]
空白载体组	3	106.79±11.92[a]	168.70±16.22[a]	131.12±4.19[a]	116.73±10.68[a]	180.18±12.08[a]
CELF/HS组	3	57.04±8.35[bc]	54.67±5.33[bc]	49.88±1.01[bc]	52.03±2.49[bc]	55.68±8.42[bc]
*F*值		24.00	31.31	135.70	103.50	206.80
*P*值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，[a]*P*<0.05；与肽聚糖组比较，[b]*P*<0.05；与空白载体组比较，[c]*P*<0.05（单因素方差分析，LSD-*t*检验）　RIPK2：受体相互作用蛋白激酶2；P-RIPK2：磷酸化受体相互作用蛋白激酶2；NF-κB：核因子κB；P-NF-κB p65：磷酸化核因子κB p65；HK2：己糖激酶2；NLRP3：NOD样受体蛋白3；ASC：含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1：胱天蛋白酶-1；N-GSDMD：Gasdermin D氨基末端结构域；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Note: Compared with the control group, [a]*P*<0.05; compared with the peptidoglycan group, [b]*P*<0.05; compared with the blank vector group, [c]*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test)　RIPK2: receptor-interacting protein kinase 2; P-RIPK2: phosphorylated receptor-interacting protein kinase 2; NF-κB: nuclear factor kappa B; P-NF-κB p65: phosphorylated nuclear factor kappa B p65; HK2: hexokinase 2; NLRP3: NOD-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; Caspase-1: cysteine-aspartic protease 1; N-GSDMD: N-terminal domain of Gasdermin D; CELF: celastrol-furoxan derivative

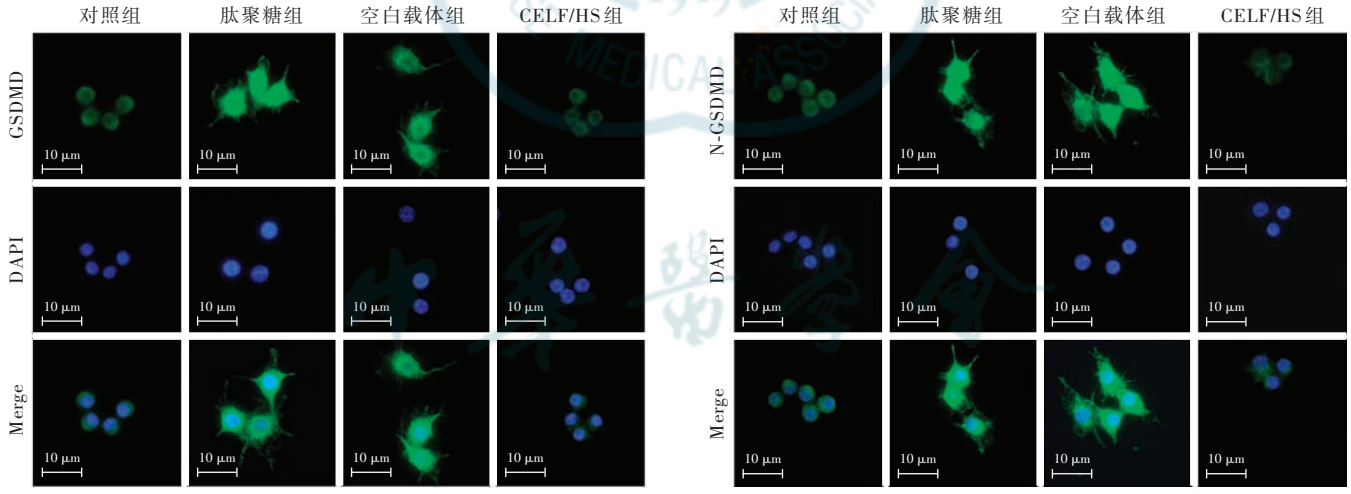


图5　各组RAW264.7细胞中GSDMD和N-GSDMD的代表性免疫荧光染色图像（标尺=10 μm）　N-GSDMD：Gasdermin D氨基末端结构域；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Figure 5　Representative immunofluorescence staining images of GSDMD and N-GSDMD in RAW264.7 cells from different groups (scale bar=10 μm)　N-GSDMD: N-terminal domain of Gasdermin D; CELF: celastrol-furoxan derivative

CELF，以期利用NO的协同作用增强CEL的治疗潜力。NO作为重要的生物信号分子，可参与氧化应激、炎症反应调控以及免疫功能维持，在炎症相关疾病治疗中具有潜在价值[17]。此外，本研究采用HS纳米胶束进行药物递送，以改善CELF的溶解性并提高局部应用性能。研究结果显示，CELF/HS能够破坏SA细菌结构并显著降低感染角膜组织中的细菌数量，提示CEL结构修饰可能增强其抗菌能力，为细菌性角膜炎治疗提供新的药物设计思路。

SA感染过程中，细菌细胞壁成分及多种毒力因子可激活宿主免疫反应，诱导炎症细胞募集和炎症介质释放，从而造成角膜组织损伤[18]。近年来，细胞焦亡作

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

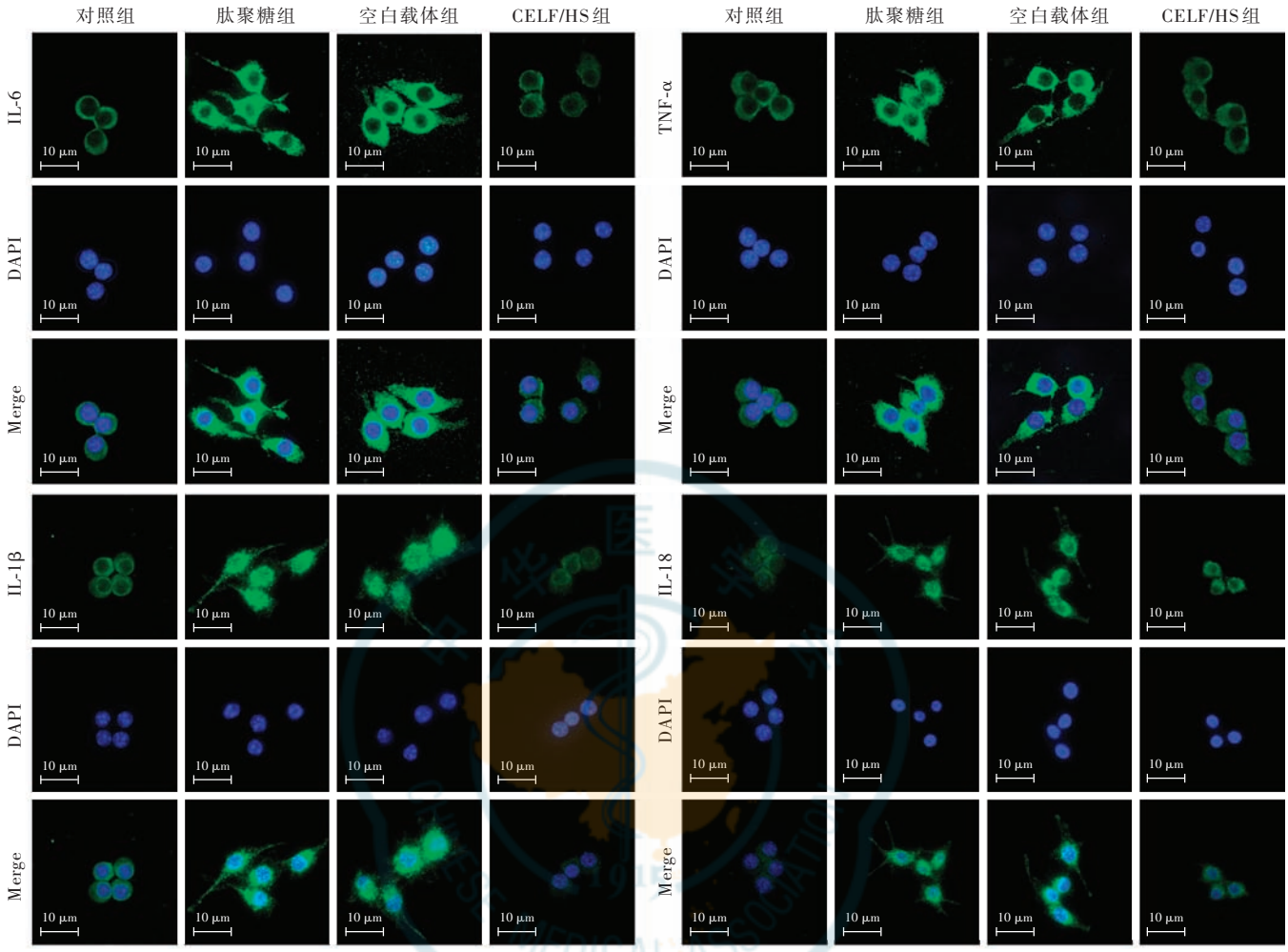


图6 各组RAW264.7细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β和IL-18代表性免疫荧光染色图像（标尺=10 μm） IL：白细胞介素；TNF-α：肿瘤坏死因子α；CELF：雷公藤红素-呋喃衍生物

Figure 6 Representative immunofluorescence staining images of IL-6, TNF-α, IL-1β, and IL-18 in RAW264.7 cells from different groups (scale bar=10 μm) IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor-α; CELF: celastrol-furoxan derivative

表2 各组RAW264.7细胞炎症因子平均荧光强度比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Comparison of mean fluorescence intensity of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-18
对照组	3	64.14±7.26	69.46±2.79	35.79±4.54	31.73±8.86
肽聚糖组	3	115.88±9.00[a]	144.41±3.88[a]	146.44±12.14[a]	135.91±11.87[a]
空白载体组	3	113.79±7.57[a]	145.64±12.50[a]	147.54±8.89[a]	133.54±12.89[a]
CELF/HS组	3	86.80±6.32[bc]	73.44±2.64[bc]	38.16±7.12[bc]	54.29±8.22[bc]
*F*值		46.28	116.50	162.70	76.55
*P*值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，[a]P<0.05；与肽聚糖组比较，[b]P<0.05；与空白载体组比较，[c]P<0.05（单因素方差分析，LSD-t检验） IL：白细胞介素；TNF-α：肿瘤坏死因子α；CELF：雷公藤红素-呋喃衍生物

Note: Compared with the control group, [a]P<0.05; compared with the peptidoglycan group, [b]P<0.05; compared with the blank vector group, [c]P<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor-α; CELF: celastrol-furoxan derivative

为一种炎症性程序性细胞死亡方式，在感染性疾病中的作用受到广泛关注。焦亡过程中，炎症小体激活可促进Caspase-1活化，进一步诱导GSDMD裂解形成N-GSDMD，导致细胞膜完整性破坏，并释放IL-1β和IL-18等促炎因子[19-20]。NLRP3炎症小体作为目前研究较为深入的炎症小体类型之一，在多种感染性及炎症性眼病中发挥重要作用，其异常激活可进一步放大炎症损伤过程[21-23]。

本研究发现，肽聚糖刺激RAW264.7巨噬细胞后，NLRP3、ASC、Caspase-1以及N-GSDMD表达明显增强，而CELF/HS处理能够显著降低上述焦亡相关蛋白水平。同时，CELF/HS在

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

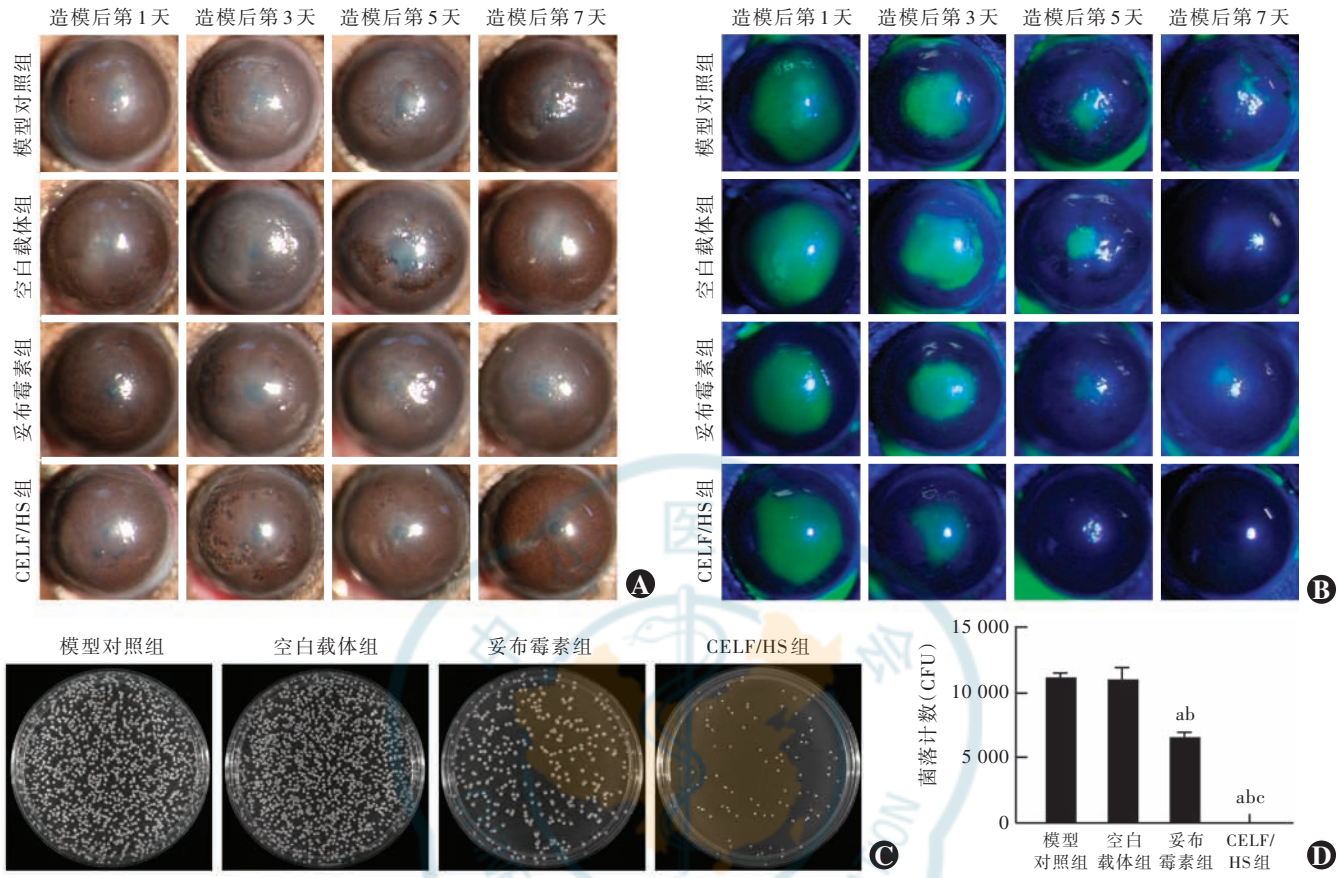


图7　CELF/HS对小鼠细菌性角膜炎的体内治疗效果　A：裂隙灯显微镜下弥散光图像（×25）　B：裂隙灯显微镜下荧光素钠染色图像（×25）　C：各组感染角膜组织第7天的组织再培养TSA平板照片　D：各组组织再培养菌落计数比较　F=297.60，P<0.001；与模型对照组比较，^{a}P<0.05；与空白载体组比较，^{b}P<0.05；与妥布霉素组比较，^{c}P<0.05（单因素方差分析，Tukey检验）　CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物；TSA：胰蛋白胨大豆琼脂；CFU：菌落形成单位

Figure 7　Therapeutic effect of CELF/HS on bacterial keratitis *in vivo*　A: Diffuse light (×25) under slit lamp microscope　B: Fluorescein sodium stained images under slit lamp microscope (×25)　C: Photos of TSA plates for re-culturing the infected corneal tissues on the 7th day of different treatments　D: Comparison of colony counts from re-cultured tissues among different groups　F=297.60, P<0.001; Compared with the model control group, ^{a}P<0.05; compared with the blank vector group, ^{b}P<0.05; compared with the tobramycin group, ^{c}P<0.05 (One-way ANOVA, Tukey test)　CELF: celastrol-furoxan derivative; TSA: tryptic soy agar; CFU: colony-forming unit

表3　各组小鼠造模后不同时间点角膜荧光素钠染色面积比较（$\bar{x}\pm s$，mm^2）

Table 3　Comparison of mice corneal fluorescein staining area at different time points after modeling among different groups（$\bar{x}\pm s$, mm^2）

组别	样本量	造模后第1天	造模后第3天	造模后第5天	造模后第7天
模型对照组	6	3.16±0.12	2.16±0.12	0.604±0.016	0.236±0.041
空白载体组	6	3.16±0.07	2.16±0.07	0.590±0.042	0.232±0.044
妥布霉素组	6	3.08±0.21	1.85±0.09^{ab}	0.253±0.008^{ab}	0.151±0.012^{ab}
CELF/HS组	6	3.16±0.07	1.16±0.07^{abc}	0.009±0.003^{abc}	0.001±0.000^{abc}
F值		0.26	81.48	471.55	38.50
P值		0.854	<0.001	<0.001	<0.001

注：与模型对照组比较，^{a}P<0.05；与空白载体组比较，^{b}P<0.05；与妥布霉素组比较，^{c}P<0.05（单因素方差分析，LSD-t检验）　CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Note: Compared with the model control group, ^{a}P<0.05; compared with the blank vector group, ^{b}P<0.05; compared with the tobramycin group, ^{c}P<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test)　CELF: celastrol-furoxan derivative

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

表4 各组小鼠造模后不同时间点角膜临床评分比较[$M(Q_1,Q_3)$，分]

Table 4 Comparison of corneal clinical scores at different time points after modeling among different groups of mice [$M(Q_1,Q_3)$, points]

组别	样本量	造模后第1天	造模后第3天	造模后第5天	造模后第7天
模型对照组	6	3.00(3.00,3.00)	3.00(2.75,3.00)	3.00(2.00,3.00)	2.00(1.00,2.00)
空白载体组	6	3.00(3.00,3.00)	3.00(2.75,3.00)	3.00(2.00,3.00)	2.00(1.00,2.00)
妥布霉素组	6	3.00(3.00,3.00)	3.00(2.00,3.00)	2.00(1.75,2.00)	1.00(1.00,2.00)
CELF/HS组	6	3.00(3.00,3.00)	1.50(1.00,2.00)^{abc}	0.00(0.00,1.00)^{ab}	0.00(0.00,0.00)^{ab}
H值			13.51	17.72	15.61
P值			0.004	0.001	0.001

注：与模型对照组比较，$^{a}P<0.05$；与空白载体组比较，$^{b}P<0.05$；与妥布霉素组比较，$^{c}P<0.05$（Kruskal-Wallis检验，Dunn检验） CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Note: Compared with the model control group, $^{a}P<0.05$; compared with the blank vector group, $^{b}P<0.05$; compared with the tobramycin group, $^{c}P<0.05$ (Kruskal-Wallis test, Dunn test) CELF: celastrol-furoxan derivative

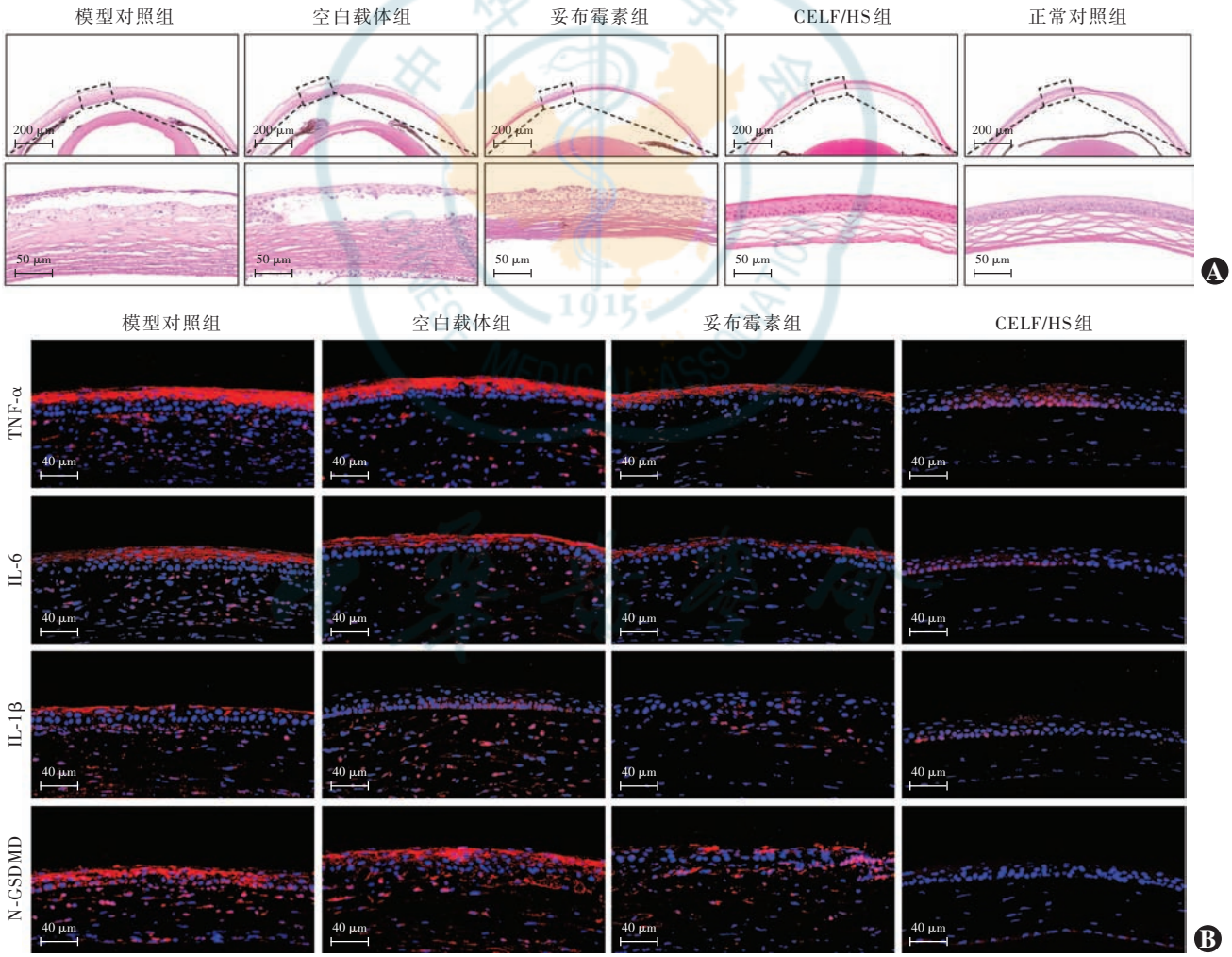


图8 造模后第7天各组小鼠角膜组织学评估 A：各组代表性苏木精-伊红染色图像（标尺=200 μm） 下图为虚框局部放大图（标尺=50 μm） B：各组角膜TNF-α、IL-6、IL-1β和N-GSDMD的代表性免疫荧光染色图像（标尺=40 μm） 细胞核采用DAPI复染（蓝色），目标蛋白呈红色荧光 TNF-α：肿瘤坏死因子α；IL：白细胞介素；N-GSDMD：Gasdermin D蛋白N端结构域；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Figure 8 Histological evaluation of mice corneal tissues on day 7 after modeling A: Representative hematoxylin-eosin staining images (scale bar=200 μm) The lower figures showed local magnification of dashed box (scale bar=50 μm) B: Representative immunofluorescence images of TNF-α, IL-6, IL-1β, and N-GSDMD (scale bar=40 μm) Nuclei were counterstained with DAPI (blue), and the target proteins were shown in red TNF-α: tumor necrosis factor-α; IL: interleukin; N-GSDMD: N-terminal domain of gasdermin D; CELF: celastrol-furoxan derivative

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

表5　各组小鼠角膜厚度和炎症细胞数量比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 5　Comparison of mice corneal thickness and inflammatory cell counts among different groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本量	角膜厚度（μm）	炎症细胞数量（个/高倍视野）
正常对照组	3	112.94±3.65	0.00±0.00
模型对照组	3	227.83±8.77[a]	251.67±15.50[a]
空白载体组	3	225.04±8.76[a]	253.00±27.22[a]
妥布霉素组	3	118.05±10.14[bc]	93.67±8.51[bc]
CELF/HS组	3	114.61±9.49[bc]	0.67±0.58[bcd]
*F*值		154.94	229.98
*P*值		<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，[a]*P*<0.05；与模型对照组比较，[b]*P*<0.05；与空白载体组比较，[c]*P*<0.05；与妥布霉素组比较，[d]*P*<0.05（单因素方差分析，LSD-t检验）　CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Note: Compared with the normal control group, [a]*P*<0.05; compared with the model control group, [b]*P*<0.05; compared with the blank vector group, [c]*P*<0.05; compared with the tobramycin group, [d]*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test)　CELF: celastrol-furoxan derivative

表6　各组小鼠角膜组织中TNF-α、IL-6、IL-1β及N-GSDMD平均荧光强度比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 6　Comparison of mean fluorescence intensity of TNF-α, IL-6, IL-1β, and N-GSDMD in mice corneal tissues among different groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本量	TNF-α	IL-6	IL-1β	N-GSDMD
模型对照组	3	216.79±5.33	186.49±7.24	195.82±5.02	218.43±7.99
空白载体组	3	214.61±8.19	180.25±15.05	193.55±2.46	218.58±10.97
妥布霉素组	3	200.74±10.93	153.77±5.74[ab]	127.69±7.90[ab]	207.52±8.68
CELF/HS组	3	148.48±6.79[abc]	90.52±4.16[abc]	88.72±6.23[abc]	23.57±8.30[abc]
*F*值		46.81	70.11	249.00	335.00
*P*值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与模型对照组比较，[a]*P*<0.05；与空白载体组比较，[b]*P*<0.05；与妥布霉素组比较，[c]*P*<0.05（单因素方差分析，LSD-*t*检验）　TNF-α：肿瘤坏死因子α；IL：白细胞介素；N-GSDMD：Gasdermin D蛋白N端结构域；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Note: Compared with the model control group, [a]*P*<0.05; compared with the blank vector group, [b]*P*<0.05; compared with the tobramycin group, [c]*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test)　TNF-α: tumor necrosis factor-α; IL: interleukin; N-GSDMD: N-terminal domain of gasdermin D; CELF: celastrol-furoxan derivative

SA感染小鼠角膜组织中可降低TNF-α、IL-6、IL-1β及N-GSDMD表达，并减少炎症细胞浸润。上述结果提示，CELF/HS可能通过抑制NLRP3炎症小体激活和GSDMD介导的焦亡过程，减少感染诱导的炎症因子释放，从而缓解角膜组织损伤。

除炎症小体介导的焦亡过程外，细菌识别相关炎症信号通路也是感染性角膜炎发生和发展的重要调控机制。RIPK2作为NOD1/NOD2下游的重要信号分子，在识别细菌来源PAMPs后可介导下游NF-κB信号激活，促进炎症因子表达[24-25]。NF-κB信号异常激活可导致TNF-α、IL-6等促炎因子持续释放，加剧感染相关组织损伤。因此，靶向RIPK2/NF-κB通路可能成为调控感染相关炎症反应的重要策略。

本研究中，肽聚糖刺激导致RAW264.7细胞中RIPK2、P-RIPK2、NF-κB p65及P-NF-κB p65表达增强，而CELF/HS处理可明显抑制上述信号分子活化，并降低IL-6和TNF-α表达。同时，动物实验进一步证实CELF/HS可减少感染角膜组织中炎症因子表达。上述结果表明，CELF/HS可能通过抑制RIPK2/NF-κB信号通路，减少炎症转录反应，从而发挥抗炎作用。

近年来，代谢重编程与炎症调控之间的联系逐渐受到关注。HK2作为糖酵解关键酶，不仅参与细胞能量代谢，同时也参与炎症信号调控。已有研究发现，HK2在线粒体功能调节以及NLRP3炎症小体活化过程中发挥重要作用[9-10]。在本研究中，CELF/HS能够降低肽聚糖诱导的HK2表达升高，并抑制NLRP3炎症小体相关蛋白及焦亡标志蛋白表达，提示HK2/NLRP3信号轴可能参与CELF/HS介导的抗炎保护过程。然而，本研究主要基于相关蛋白表达变化进行验证，尚未进一步检测HK2与VDAC相互作用、线粒体DNA释放以及线粒体功能变化，因此该信号轴的具体调控机制仍需进一步研究。

综合上述结果，本研究认为CELF/HS可能通过多靶点协同作用发挥治疗效果。一方面，CELF/HS直接降低SA感染负荷，发挥抗菌作用；另一方面，通过同时调节RIPK2/NF-κB炎症信号和HK2/NLRP3/GSDMD焦亡通路，抑制炎症启动和炎症放大过程，减少促炎因子释放并保护角膜组织结构完整性。基于本研究结果，提出CELF/HS治疗SA诱导细菌性角膜炎的潜在作用机制模型（图9）。

尽管本研究证明了CELF/HS在细菌性角膜炎治疗中的潜在价值，但仍存在一定局限性。首先，本研究未直接检测CELF释放NO水平，也未设置CEL单独处理组，因此无法完全明确CEL母体结构与NO供体基团对于治疗作用的具体贡献。其次，本研究主要通过蛋白表达变化评价HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB信号调控作用，未来仍需结合基因敲除、特异性抑制剂等方法进一步验证关键靶点。此外，CELF/HS长期眼部安全性、药代动力学特征以及临床转化价值仍需要进一步研究。

综上，本研究首次探索了CELF/HS在SA诱导细菌性角膜炎中的治疗作用，并揭示其可能通过调控HK2/NLRP3和RIPK2/NF-κB信号通路，抑制细胞焦亡

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House　版权所有　违者必究

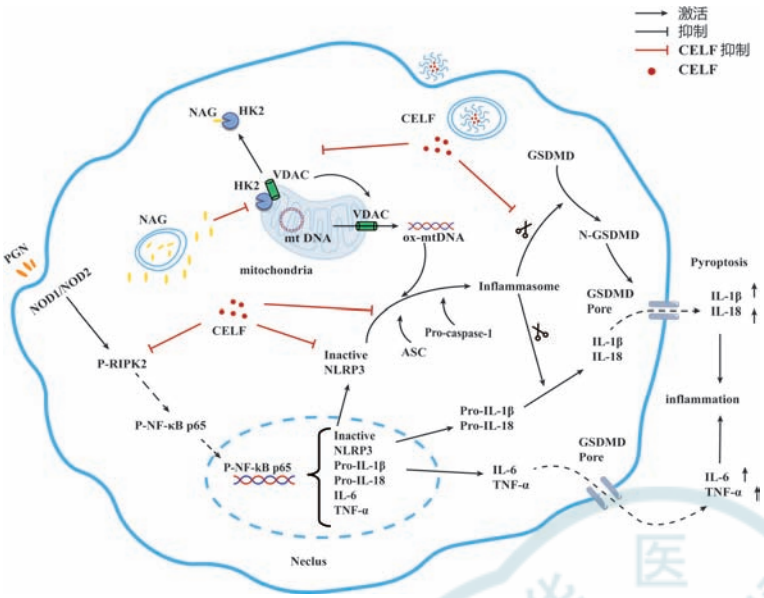


图9 CELF/HS治疗金黄色葡萄球菌诱导细菌性角膜炎的作用机制模式图

P-RIPK2：磷酸化受体相互作用蛋白激酶2；P-NF-κB p65：磷酸化核因子κB p65；HK2：己糖激酶2；NLRP3：NOD样受体蛋白3；ASC：含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1：胱天蛋白酶-1；N-GSDMD：Gasdermin D氨基末端结构域；IL：白细胞介素；TNF-α：肿瘤坏死因子α；CELF：雷公藤红素-呋咱衍生物

Figure 9 Proposed mechanism underlying the therapeutic effects of CELF/HS against *Staphylococcus aureus*-induced bacterial keratitis P-RIPK2: phosphorylated receptor-interacting protein kinase 2; P-NF-κB p65: phosphorylated nuclear factor κB p65; HK2: hexokinase 2; NLRP3: NOD-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; Caspase-1: cysteine-aspartic protease 1; N-GSDMD: N-terminal domain of Gasdermin D; IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor-α; CELF: celastrol-furoxan derivative

及炎症反应，从而发挥抗菌抗炎双重保护作用。本研究为细菌性角膜炎的治疗提供了新的药物设计策略，也为天然产物结构修饰联合纳米递送系统在感染性眼病中的应用提供了新的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王梦珂：实施研究、分析数据、统计分析、起草及修改文章；刘康：实施研究、采集数据、统计分析；王望：设计实验、采集数据；冯华阳：实施研究、采集数据；李佳珂、邓钰婷：实施研究、统计分析；李景果：实验设计与指导、文章审阅及修改；栗占荣：设计实验、指导实验、对文章审阅修改及定稿

参考文献

[1] Lin A, Rhee MK, Akpek EK, et al. Bacterial keratitis preferred practice pattern®[J]. Ophthalmology, 2019, 126(1): P1-P55. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.10.018.
[2] Shah S, Wozniak R. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infectious keratitis: key bacterial mechanisms that mediate pathogenesis and emerging therapeutics[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1250257. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1250257.
[3] Yan C, Zhao H, Pan Q, et al. Novel treatments for bacterial keratitis: a review[J]. Int J Pharm, 2025, 681: 125793. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.125793.
[4] Tuft S, Somerville TF, Li JO, et al. Bacterial keratitis: identifying the areas of clinical uncertainty[J]. Prog Retin Eye Res, 2022, 89: 101031. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.101031.
[5] Li Y, Gao W, Qiu Y, et al. RING1 dictates GSDMD-mediated inflammatory response and host susceptibility to pathogen infection[J]. Cell Death Differ, 2025, 32(11): 2066-2077. DOI: 10.1038/s41418-025-01527-2.
[6] Chai Q, Yu S, Zhong Y, et al. A bacterial phospholipid phosphatase inhibits host pyroptosis by hijacking ubiquitin[J]. Science, 2022, 378(6616): eabq0132. DOI: 10.1126/science.abq0132.
[7] Barnett KC, Li S, Liang K, et al. A 360° view of the inflammasome: mechanisms of activation, cell death, and diseases[J]. Cell, 2023, 186(11): 2288-2312. DOI: 10.1016/j.cell.2023.04.025.
[8] Larochelle J, Tishko RJ, Yang C, et al. Receptor-interacting protein kinase 2 (RIPK2) profoundly contributes to post-stroke neuroinflammation and behavioral deficits with microglia as unique perpetrators[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 221. DOI: 10.1186/s12974-023-02907-6.
[9] Jing G, Gong H, Wang H, et al. OTUD1 exacerbates sepsis-associated encephalopathy by promoting HK2 mitochondrial release to drive microglia pyroptosis[J]. J Neuroinflammation, 2025, 22(1): 154. DOI: 10.1186/s12974-025-03480-w.
[10] Baik SH, Ramanujan VK, Becker C, et al. Hexokinase dissociation from mitochondria promotes oligomerization of VDAC that facilitates NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Sci Immunol, 2023, 8(84): eade7652. DOI: 10.1126/sciimmunol.ade7652.
[11] Xu S, Feng Y, He W, et al. Celastrol in metabolic diseases: progress and application prospects[J]. Pharmacol Res, 2021, 167: 105572. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105572.
[12] Meng Z, Liu Q, Chen H, et al. Therapeutic potential of celastrol in bacterial infections: current research advancements and future perspectives[J]. Pharmacol Res, 2025, 216: 107774. DOI: 10.1016/j.phrs.2025.107774.
[13] Jing M, Yang J, Zhang L, et al. Celastrol inhibits rheumatoid arthritis through the ROS-NF-κB-NLRP3 inflammasome axis [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107879. DOI: 10.1016/j.intimp.2021. 107879.
[14] Li SM, Chou JY, Tsai SE, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of NO-releasing furoxan/1,2,4-triazole hybrid derivatives[J]. Eur J Med Chem, 2023, 257: 115496. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023. 115496.
[15] Geng W, Liu X, Tao B, et al. Nitric oxide scavenging and hydrogen sulfide production synergistically treat rheumatoid arthritis[J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(4): e2202380. DOI: 10.1002/adhm. 202202380.
[16] Ning Q, Sun X, Cui H, et al. Dual-corn-derived nanofiber membrane for subconjunctival injury: sequential release of dual-natural products for programmed anti-inflammation and anti-fibrosis[J]. J Control Release, 2025, 381: 113577. DOI: 10.1016/j.jconrel.2025.02.073.
[17] Dai Y, Zhang J, Zhang S, et al. Ag/Cu nanoparticles-loaded glycocalyx biomimetic corneal bandage lenses for combatting bacterial keratitis[J]. J Control Release, 2024, 376: 382-394. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.10.015.
[18] Carion TW, Kracht D, Strand E, et al. VIP modulates the ALX/FPR2 receptor axis toward inflammation resolution in a mouse model of bacterial keratitis[J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2019, 140: 18-25. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2018.12.001.
[19] Man MQ, Wakefield JS, Mauro TM, et al. Regulatory role of nitric oxide in cutaneous inflammation[J]. Inflammation, 2022, 45(3): 949-964. DOI: 10.1007/s10753-021-01615-8.
[20] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153-158. DOI: 10.1038/nature18629.
[21] Chen H, Zhang J, He Y, et al. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases[J]. Toxins (Basel), 2022, 14(7): 464. DOI: 10.3390/toxins14070464.
[22] Vande Walle L, Lamkanfi M. Drugging the NLRP3 inflammasome: from signalling mechanisms to therapeutic targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2024, 23(1): 43-66. DOI: 10.1038/s41573-023-00822-2.
[23] Maran JJ, Adesina MM, Green CR, et al. The central role of the NLRP3 inflammasome pathway in the pathogenesis of age-related diseases in the eye and the brain[J]. Ageing Res Rev, 2023, 88: 101954. DOI: 10.1016/j.arr.2023.101954.
[24] Xu Y, Lin F, Liao G, et al. Ripks and neuroinflammation[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(9): 6771-6787. DOI: 10.1007/s12035-024-03981-4.
[25] Cheng X, Barakat R, Pavani G, et al. Nod1-dependent NF-kB activation initiates hematopoietic stem cell specification in response to small Rho GTPases[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 7668. DOI: 10.1038/s41467-023-43349-1.

（收稿日期：2026-02-21 修回日期：2026-09-16）

（本文编辑：施晓萌 骆世平）

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究