doi:10.11659/jjssx.06E025055

·基础研究·

ECHS1改善脓毒症肺血管内皮屏障功能障碍的机制研究

杨瑞博[1,2],谭 磊[2],刘程曦[1],王 燕[1]（1.南华大学附属第二医院麻醉科,湖南 衡阳 421000;2.陆军特色医学中心麻醉科,重庆 400042）

［摘 要］ **目的** 探究短链烯酰辅酶A水合酶1(ECHS1)在脓毒症肺血管内皮屏障功能障碍中的作用及潜在机制。**方法** 在动物水平将成年SD大鼠随机分为假手术(Sham)组、脓毒症(Sepsis)组和ECHS1敲低(AAV-shECHS1)组。Sham组大鼠仅开关腹,Sepsis组大鼠行盲肠结扎穿孔术构建脓毒症模型,AAV-shECHS1组大鼠于建模前4周经尾静脉注射ECHS1敲低腺相关病毒。Western blot检测ECHS1蛋白表达。在建模12 h后观察各组大鼠存活情况;取各组大鼠肺组织行HE染色,评估大鼠肺组织损伤;进行血管通透性测定。细胞水平培养原代肺静脉内皮细胞(VECs),通过脂多糖(LPS)刺激模拟脓毒症模型,利用腺病毒敲低ECHS1,测定VECs的电阻率、ECHS1表达及赖氨酸巴豆酰化(Kcr)修饰水平,经转录组学分析获得关键差异基因。**结果** 脓毒症大鼠出现肺损伤及肺血管内皮屏障功能障碍,表现为肺组织结构破坏和肺VECs通透性增加;大鼠存活率显著下降,生存时间缩短,同时伴肺VECs的Kcr修饰水平显著降低,ECHS1表达显著升高。敲低ECHS1可有效上调脓毒症VECs的Kcr修饰水平,改善肺血管内皮屏障功能和肺损伤,显著提高大鼠存活率,延长生存时间。**结论** 敲低ECHS1可上调VECs的Kcr水平,从而改善脓毒症大鼠血管内皮屏障功能。

［关键词］脓毒症;大鼠;血管内皮屏障功能;巴豆酰化;短链烯酰辅酶A水合酶1
［中图分类号］R563;R631 ［文献标志码］A ［收稿日期］2025-06-12

Mechanism of ECHS1 in ameliorating sepsis-induced pulmonary vascular endothelial barrier dysfunction

YANG Rui-bo[1,2], TAN Lei[2], LIU Cheng-xi[1], WANG Yan[1] (1. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang Hunan 421000, China; 2. Department of Anesthesiology, Army Medical Center of PLA, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role and underlying mechanism of short-chain enoyl-CoA hydratase 1 (ECHS1) in sepsis-induced pulmonary vascular endothelial barrier dysfunction. **Methods** Adult SD rats were randomly divided into the Sham group, Sepsis group, and ECHS1 knockdown (AAV-shECHS1) group. Rats in the Sham group underwent only laparotomy, while rats in the Sepsis group underwent cecal ligation and puncture to construct a sepsis model, and rats in the AAV-shECHS1 group were injected with ECHS1-knockdown adeno-associated virus via the tail vein 4 weeks before modeling. The expression of ECHS1 protein was detected by Western blot. The survival of rats in each group was observed 12 hours after modeling; the lung tissues of rats in each group were collected for HE staining to evaluate lung tissue injury, and vascular permeability was determined. Primary pulmonary vascular endothelial cells (VECs) were cultured and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to simulate the sepsis model, and ECHS1 was knocked down in cells using adenovirus. The electrical resistance of VECs, the expression of ECHS1, and the levels of lysine crotonylation (Kcr) were detected, and transcriptomic analysis was then performed to identify key differentially expressed genes. **Results** Septic rats developed lung injury and pulmonary vascular endothelial barrier dysfunction, characterized by destruction of lung tissue structure and increased permeability of pulmonary VECs; in addition, the survival rate of the rats was significantly decreased, along with shortened survival time. Meanwhile, the Kcr modification level in pulmonary VECs was significantly reduced, while the expression of ECHS1 was significantly increased. Knockdown of ECHS1 effectively upregulated the Kcr modification level in septic VECs, improved pulmonary vascular endothelial barrier function and lung injury, significantly increased the survival rate, and prolonged the survival time of septic rats. **Conclusion** Knockdown of ECHS1 upregulates Kcr levels in VECs, thereby improving vascular endothelial barrier function in septic rats.

Keywords: sepsis; rats; vascular endothelial barrier function; lysine crotonylation; short-chain enoyl-CoA hydratase 1

［基金项目］国家自然科学基金(82300561);重庆市科卫联合青年项目(2025QNXM038);陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2023XLC11)
［通信作者］王 燕,E-mail:1609779291@qq.com

脓毒症是宿主对感染失调引发的全身性炎症综合征,常导致多器官功能障碍,甚至死亡[1]。在脓毒症病理过程中,肺是最易受累的器官之一,急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征是其致命性并发症[2]。血管内皮屏障功能障碍在该病理过程中起核心作用[3]。肺血管内皮细胞(vascular endothelial cells,VECs)通过紧密连接和黏附连接构成动态屏障,调控液体、蛋白及炎症细胞的跨内皮转运。脓毒症时,在炎症刺激下,血管内皮屏障被破坏,血浆蛋白及炎症细胞外渗,从而引发肺水肿、低氧血症及多器官衰竭[4]。尽管目前已有针对病原体清除和炎症调控的治疗策略,但直接调控血管内皮屏障稳定性的干预措施仍缺乏,且现有治疗方法在逆转血管渗漏方面效果有限,因此阐明脓毒症内皮损伤的机制并寻找全新靶点具有重要意义。

蛋白翻译后修饰在细胞信号转导和疾病发生中发挥关键作用[5]。赖氨酸巴豆酰化(lysine crotonylation,Kcr)是一种新型酰化修饰,由巴豆酰CoA通过组蛋白或非组蛋白赖氨酸残基的ε-氨基形成[6]。研究表明,Kcr通过调控基因转录和代谢酶活性参与炎症、组织损伤及细胞凋亡过程[7]。在急性肾损伤中,小鼠肾组织中的组蛋白Kcr修饰水平明显升高[8]。在脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)刺激诱导炎症反应前补充巴豆酸,能够使用于炎症及脓毒症研究的小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞中组蛋白Kcr水平升高[9]。此外,短链烯酰辅酶A水合酶1(short-chain enoyl-CoA hydratase 1,ECHS1)和组蛋白Kcr在维持心肌细胞成熟和稳态中具有重要作用[10],Kcr还可参与心脏、肾等重要器官功能调节[11],但其在血管内皮屏障功能中的作用尚不明确。因此,本研究通过建立大鼠脓毒症模型,探究Kcr在脓毒症血管内皮屏障功能中的作用及机制,旨在为脓毒症的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 动物来源及主要试剂

106只SPF级SD大鼠,体质量(200±20)g,雌雄各半,由陆军特色医学中心实验动物中心提供[使用许可证号:SYXK(渝)2022-0003]。大鼠自由饮食进水,实验前12 h禁食,4 h禁饮。所有动物实验操作均经陆军特色医学中心动物实验伦理委员会批准(批准号:AMUWEC20224867)。

LPS、异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin,FITC-BSA)购自美国Sigma公司,Anti-β-actin抗体购自美国CST公司,Anti-ECHS1抗体及山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司,Anti-Kcr抗体购自杭州景杰生物科技股份有限公司。ECHS1敲低腺病毒与腺相关病毒购自上海和元生物技术股份有限公司。

1.2 动物实验

1.2.1 脓毒症大鼠模型建立 脓毒症模型大鼠采用盲肠结扎穿孔术制备。大鼠经腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,待丧失针刺反应后,仰卧位固定四肢。腹部皮肤常规消毒后,沿腹白线切开腹腔。轻柔剪取部分大网膜,于盲肠末端约0.5 cm处结扎。使用无菌穿刺针贯穿盲肠壁,将盲肠轻轻送回腹腔,分层缝合关闭腹腔。术后大鼠单笼饲养,禁食,可自由饮水,12 h后观察大鼠平均动脉压,当平均动脉压下降30%以上,表明建模成功。78只SPF级SD大鼠用于建模,68只建模成功,模型成功率在85%以上。

1.2.2 动物分组及处理 将106只SD大鼠按照随机数字表法分为假手术(Sham)组(28只)、脓毒症(Sepsis)组(46只)和ECHS1敲低(AAV-shECHS1)组(32只)。Sepsis组大鼠构建脓毒症模型,40只建模成功;而AAV-shECHS1组大鼠于建模前4周经尾静脉注射ECHS1敲低腺相关病毒,每只1.0×10^{12} vg,28只建模成功;Sham组大鼠仅开关腹。建模后12 h,所有大鼠经肌肉注射抗生素(青霉素+链霉素),随后放回经消毒的独立饲养笼中,恢复自由摄食饮水。

1.2.3 大鼠生存情况观察 建模后第12小时起,每30 min观察大鼠状态,持续观察至建模后36 h,期间记录大鼠的生存情况及死亡时间,计算存活率,并绘制*Kaplan-Meier*生存曲线。

1.2.4 大鼠肺血管通透性测定 大鼠麻醉后固定,经颈静脉导管注射FITC-BSA(9 mg/kg)。2 h后,经颈静脉注射肝素生理盐水40 mL,依次结扎腹主动脉、下腔静脉,剪断腹主动脉,持续灌洗至肺颜色变白。取左肺上叶称重。将肺组织剪碎后完全匀浆处理,使用F-4500荧光分光光度计测定FITC-BSA的荧光强度,计算肺组织FITC-BSA渗漏率,评估肺血管通透性[12]。FITC-BSA渗漏率=荧光强度/肺组织质量。

1.2.5 大鼠肺组织损伤评估 取大鼠左肺组织于4%多聚甲醛中固定48 h后,脱水、石蜡包埋、切片、HE染色,显微镜下观察肺组织病理改变。采用Smith评分法[13]对肺水肿、肺泡及间质炎症、肺泡及间质出血、肺不张、透明膜形成进行半定量分析。无损伤为0分,病变范围<25%为1分,病变范围25%~<50%为2分,病变范围50%~<75%为3分,病变满视野为4分。

1.3 细胞实验

1.3.1 肺静脉原代VECs培养与处理 从正常SD大鼠的肺静脉中提取VECs。先对大鼠进行麻醉后碘伏消毒,打开胸腔,分离肺静脉。将肺静脉切成约1 mm×1 mm的小块,均匀贴附到培养瓶底部,置于37 ℃培养箱中孵育。待组织块完全贴壁后,加入ECM细胞培养基培养72 h,小心移除组织块,瓶底迁移贴壁的细胞即为VECs。取第3~5代的VECs进行后续研究。

1.3.2 细胞分组及处理 将VECs分为正常对照(Nor)组、LPS组、ECHS1敲低(shECHS1)组。LPS组VECs使用1 μg/mL LPS处理12 h。shECHS1组VECs转染ECHS1敲低腺病毒,具体步骤如下:将VECs消化后稀释至3×10^5/mL,加入24孔板中,每孔500 μL,然后放入37 ℃、5% CO_2培养箱中培养过夜。当细胞汇合率在30%~50%时,吸去培养基,加入1/2体积新鲜培养基,根据预实验摸索的感染复数值(100),加入相应体积腺病毒轻轻混匀,感染16 h后,换新鲜完全培养液继续37 ℃培养。感染48 h后,收集细胞检测干扰效率。shECHS1序列为5′-GACGTTAACAGAAGGAAATAA-3′。

1.3.3 VECs电阻率测定 将VECs种植在Transwell上层(6孔,0.4 μm),当细胞生长到完全融合时,给予LPS处理。使用电阻仪每2 h记录1次细胞跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)值,持续24 h。未种植细胞的室孔作为空白对照。电阻率=(实际TEER值−空白对照TEER值)/实际TEER值。

1.3.4 VECs转录组学分析 收集正常和LPS刺激后的VECs,每组设3个生物学重复,预冷PBS冲洗细胞后,加入Trizol试剂充分裂解细胞,提取总RNA。由上海吉凯基因公司完成样本质控、链特异性文库构建及Illumina平台高通量测序,按照|log2FC|>0且$P<0.05$的标准筛选转录组差异表达基因,结合文献检索获取Kcr修饰相关基因集[14-15],并经韦恩分析将转录组测序差异基因与Kcr修饰相关基因取交集,得到关键差异基因。

1.3.5 Kcr水平检测 收集各组细胞,使用RIPA裂解液冰上裂解30 min,离心取上清,BCA法测定总蛋白浓度。等量蛋白样品分2份进行SDS-PAGE凝胶独立电泳,其中1份凝胶经考马斯亮蓝染色脱色后,作为蛋白上样内参;另1份凝胶采用湿转法将蛋白转印至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗膜3次备用。加入Kcr泛抗体4 ℃孵育过夜,TBST洗膜后加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗,室温孵育1 h。ECL化学发光法显影曝光,用Image J软件分析条带灰度值,以考马斯亮蓝染色条带校正上样量,分析各组细胞整体Kcr修饰水平。

1.4 ECHS1蛋白测定

提取肺组织及VECs中总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳。电泳结束后,将蛋白转移至PVDF膜,室温下使用5%(w/v)脱脂牛奶封闭1 h。用TBST洗膜3次后,将膜与ECHS1蛋白一抗(稀释比1∶1 000)在4 ℃下孵育过夜;次日,用TBST洗膜3次后,将膜与对应二抗(稀释比1∶20 000)在室温下孵育1 h;再次用TBST清洗3次,使用ECL底物进行显影并捕获图像。

1.5 统计学分析

使用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料经正态性检验均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较方差齐采用单因素方差分析(*one-way ANOVA*);若方差不齐,采用*Tamhane's T2*法进行组间两两比较。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症引起肺血管内皮屏障功能障碍

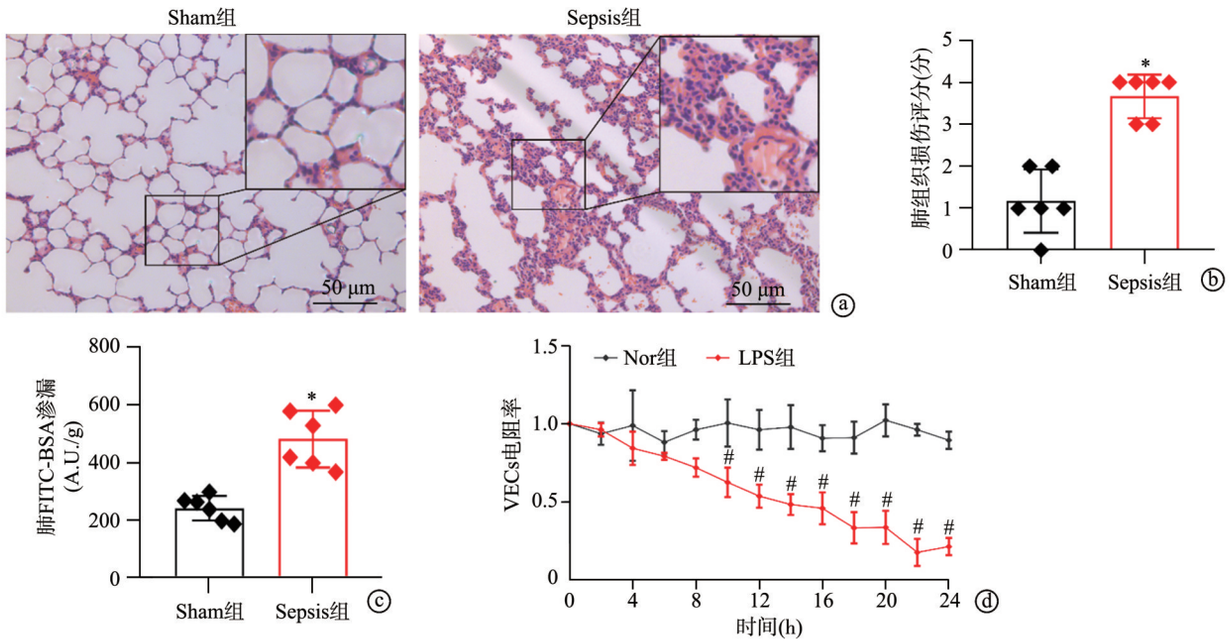
Sham组大鼠肺组织结构完整,未见明显出血及炎症细胞浸润;Sepsis组大鼠肺组织明显损伤,出现炎症细胞浸润、肺泡结构破坏和间质水肿(图1a)。与Sham组比较,Sepsis组大鼠肺组织损伤评分显著升高($P<0.05$),肺血管通透性显著增加($P<0.05$),见图1b、c。体外细胞实验进一步显示,与Nor组相比,LPS组VECs电阻率显著降低($P<0.05$),见图1d。上述结果表明,脓毒症可导致肺血管内皮屏障功能损伤。

2.2 上调ECHS1抑制Kcr与脓毒症肺血管内皮屏障功能障碍有关

经转录组学测序,获得关键差异基因ECHS1,其在LPS刺激后显著上调(图2a、b)。Western blot检测结果显示,Sepsis组大鼠肺组织中ECHS1蛋白表达高于Sham组,LPS组VECs中ECHS1蛋白表达高于Nor组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图2c~f。LPS组VECs中Kcr修饰水平较Nor组下降($P<0.05$),见图2g、h。

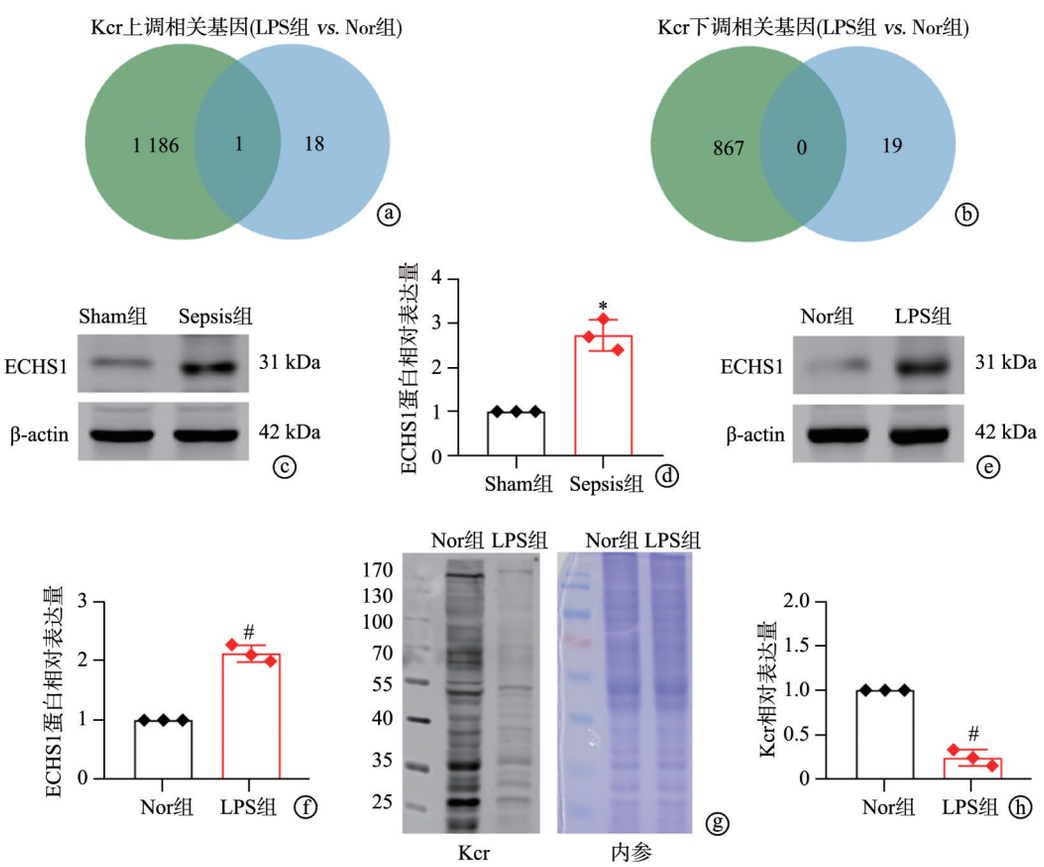
2.3 敲低ECHS1上调Kcr并改善脓毒症肺血管内皮屏障功能

AAV-shECHS1组大鼠肺组织中ECHS1蛋白表达低于Sepsis组,shECHS1组VECs中ECHS1蛋白表达低于LPS组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图3a~d。体外敲低ECHS1可上调VECs中Kcr修饰水平($P<0.05$),增加VECs电阻率($P<0.05$),见图3e~g。同时,体内敲



a:肺组织HE染色;b:肺组织损伤评分;c:大鼠肺血管通透性检测;d:VECs电阻率检测 *:与Sham组相比,$P<0.05$;#:与Nor组相比,$P<0.05$

图1 脓毒症损伤肺血管内皮屏障功能



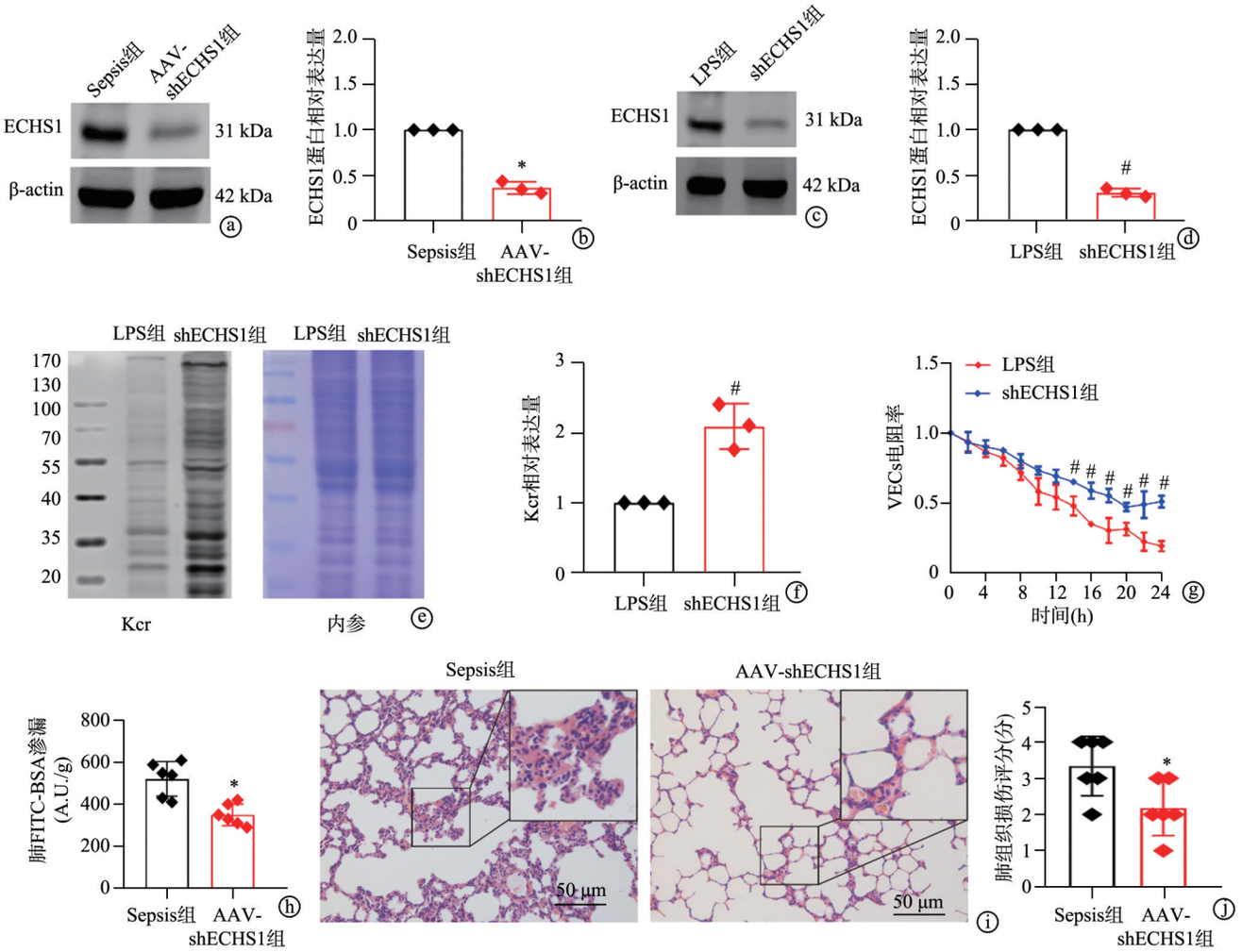
a、b:韦恩分析LPS刺激后上调、下调差异基因(绿色)与Kcr修饰相关基因(蓝色)交集;c、d:肺组织中ECHS1蛋白表达;e、f:VECs中ECHS1蛋白表达;g、h:VECs中Kcr修饰水平 *:与Sham组相比,$P<0.05$;#:与Nor组相比,$P<0.05$

图2 上调ECHS1抑制Kcr与脓毒症肺血管内皮屏障功能障碍有关

低ECHS1还可降低脓毒症大鼠肺血管通透性,改善肺组织病理损伤(P<0.05),见图3h~j。

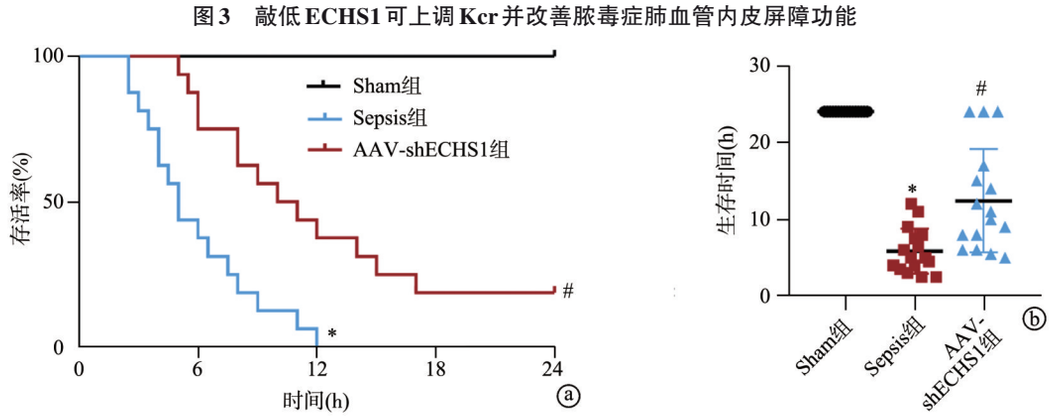
2.4　敲低ECHS1对脓毒症大鼠生存的影响

大鼠造模后24 h内死亡,因此统计了24 h生存时间和存活率。结果显示,Sepsis组大鼠生存时间为(5.9±2.9)h,短于AAV-shECHS1组的(12.4±6.7)h(P<0.05);AAV-shECHSI组大鼠存活率高于Sepsis组(P<0.05),存活率提升至30%,见图4。



a、b:肺静脉组织中ECHS1蛋白表达;c、d:VECs中ECHS1蛋白表达;e、f:敲低ECHS1对VECs中Kcr修饰水平的影响;g:敲低ECHS1对LPS刺激后VECs电阻率的影响;h:敲低ECHS1对脓毒症大鼠肺血管通透性的影响;i、j:敲低ECHS1对脓毒症大鼠肺组织损伤的影响　*:与Sepsis组相比,P<0.05;#:与LPS组相比,P<0.05

图3　敲低ECHS1可上调Kcr并改善脓毒症肺血管内皮屏障功能



a:*Kaplan-Meier*曲线;b:生存时间　*:与Sham组相比,P<0.05;#:与Sepsis组相比,P<0.05

图4　敲低ECHS1改善脓毒症大鼠生存情况

3 讨论

脓毒症引发的血管内皮屏障功能障碍可导致血管渗漏,是脓毒症多器官功能障碍的核心病理环节之一[16]。肺血管内皮屏障破坏可直接引发肺间质与肺泡水肿、炎症细胞浸润,显著增加患者死亡风险[17]。脓毒症时促炎信号刺激内皮细胞,导致细胞间紧密连接和黏附连接被破坏,内皮通透性显著增加[18]。此外,血管渗漏并非局限于肺组织,全身内皮屏障的广泛性损伤会引发肝、肾等多器官微循环障碍与功能衰竭[19-20]。本研究聚焦肺血管内皮屏障,通过体内外实验探究ECHS1对肺血管内皮屏障的影响,以期为靶向血管内皮屏障干预脓毒症器官损伤提供理论依据。

蛋白翻译后修饰通过调控蛋白结构、亚细胞定位与分子互作,在脓毒症免疫激活、细胞功能失衡中具有重要作用[21-22]。Kcr作为近年发现的新型酰化修饰,以巴豆酰CoA为供体,通过修饰组蛋白或非组蛋白参与基因表达、细胞代谢等过程[6]。既往研究表明,脓毒症器官损伤与蛋白翻译后修饰密切相关,肺巨噬细胞内CIRP蛋白乳酸化可导致内皮细胞死亡[23]。此外,调控组蛋白乙酰化可抑制巨噬细胞中的氧化应激和细胞焦亡[24]。本研究结果显示,脓毒症可显著降低VECs中的Kcr修饰水平,而敲低ECHS1可恢复Kcr修饰水平并改善VECs屏障功能,提示Kcr修饰异常是脓毒症内皮屏障功能障碍的重要分子基础。这一发现为解析Kcr修饰调控脓毒症器官损伤提供了新的靶点。

ECHS1是脂肪酸β-氧化通路的关键酶,其核心功能是催化2-反式烯酰CoA中间体水合为L-3-羟酰基CoA,维持重要器官的能量代谢[25]。代谢通路与酰化修饰存在紧密的“供体-调控”关系。巴豆酰CoA作为Kcr的直接供体,其水平受脂肪酸代谢、三羧酸循环等严格调控[6]。已有研究证实,ECHS1上调可通过减少巴豆酰CoA,抑制Kcr修饰[15]。本研究进一步研究发现,脓毒症状态下ECHS1表达上调可抑制内皮细胞Kcr修饰,这可能是其引发屏障功能障碍的重要机制,也为靶向ECHS1-Kcr轴进行干预提供了合理解释。

综上,敲低ECHS1可有效上调脓毒症VECs的Kcr修饰,改善肺血管内皮屏障功能和肺组织损伤,进而改善脓毒症大鼠生存结局。然而本研究仅在动物和细胞模型验证,结论仍需在临床研究中进一步证实;此外,尚未明确ECHS1调控Kcr后,影响内皮通透性的关键靶蛋白与具体修饰位点,相关分子机制仍需后续深入探索。

[参考文献]

[1] She H, Tan L, Du Y, et al. VDAC2 malonylation participates in sepsis-induced myocardial dysfunction via mitochondrial-related ferroptosis [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(10): 3143-3158. doi: 10.7150/ijbs.84613.

[2] Park I, Kim M, Choe K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury[J]. Eur Respir J, 2019, 53(3): 1800786. doi: 10.1183/13993003.00786-2018.

[3] She H, Zhu Y, Deng H, et al. Protective effects of dexmedetomidine on the vascular endothelial barrier function by inhibiting mitochondrial fission via ER/mitochondria contact[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 636327. doi: 10.3389/fcell.2021.636327.

[4] She H, Hu Y, Zhou Y, et al. Protective effects of dexmedetomidine on sepsis-induced vascular leakage by alleviating ferroptosis via regulating metabolic reprogramming[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 6765-6782. doi: 10.2147/JIR.S340420.

[5] Wang Y, Hu J, Wu S, et al. Targeting epigenetic and posttranslational modifications regulating ferroptosis for the treatment of diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 449. doi: 10.1038/s41392-023-01720-0.

[6] Yuan H, Wu X, Wu Q, et al. Lysine catabolism reprograms tumour immunity through histone crotonylation[J]. Nature, 2023, 617(7962): 818-826. doi: 10.1038/s41586-023-06061-0.

[7] Jiang G, Li C, Lu M, et al. Protein lysine crotonylation: past, present, perspective[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 703. doi: 10.1038/s41419-021-03987-z.

[8] Ruiz-Andres O, Sanchez-Niño M, Cannata-Ortiz P, et al. Histone lysine crotonylation during acute kidney injury in mice[J]. Dis Model Mech, 2016, 9(6): 633-645. doi: 10.1242/dmm.024455.

[9] Sabari B, Tang Z, Huang H, et al. Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation[J]. Mol Cell, 2015, 58(2): 203-215. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.029.

[10] Tang X, Chen X, Sun X, et al. Short-chain enoyl-CoA hydratase mediates histone crotonylation and contributes to cardiac homeostasis[J]. Circulation, 2021, 143(10): 1066-1069. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049438.

[11] Zheng J, Wang Q, Xu K, et al. Fluoride induces immune-inflammatory disorder in the kidneys via histone lysine crotonylation in vivo[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 288: 117385. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.117385.

[12] Zheng D, Zhang J, Zhang Z, et al. Endothelial microvesicles induce pulmonary vascular leakage and lung injury during sepsis[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 643. doi: 10.3389/fcell.2020.00643.

[13] Eltzschig H, Bratton D, Colgan S. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(11): 852-869. doi: 10.1038/nrd4422.

[14] Jiang L, Yin X, Zhang H, et al. Development and validation of a prognostic signature based on the lysine crotonylation regulators in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2023, 2023: 4444869. doi: 10.1155/2023/4444869.