

• 论著 •

# 内质网应激凋亡信号途径在脓毒症脾淋巴细胞凋亡中的作用研究

马涛 韩璐 胡文全

**【摘要】** 目的 研究内质网应激凋亡信号途径在脓毒症脾淋巴细胞凋亡中的作用。方法 24 只 C57BL/6 小鼠被随机分为模型组和假手术(sham)组,每组 12 只。用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型,术后 24 h 处死动物后取脾脏,用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测脾淋巴细胞凋亡,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的 mRNA 和蛋白表达。结果 CLP 组脾淋巴细胞凋亡指数较 sham 组明显增加( $52 \pm 17$  比  $5 \pm 3$ ,  $P < 0.01$ );且 CLP 组 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 和蛋白表达亦较 sham 组明显增加(GRP78 mRNA:  $0.807 \pm 0.122$  比  $0.314 \pm 0.107$ , CHOP mRNA:  $0.923 \pm 0.085$  比  $0.221 \pm 0.074$ ; GRP78 蛋白:  $5.216 \pm 1.351$  比  $2.733 \pm 0.421$ , CHOP 蛋白:  $3.170 \pm 1.227$  比  $0.403 \pm 0.142$ ,  $P$  均  $< 0.01$ )。结论 脓毒症时脾淋巴细胞中存在内质网应激反应,并通过上调 CHOP 表达的机制诱导凋亡。

**【关键词】** 脓毒症; 内质网应激; 细胞凋亡

**Study of the role of endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis signal pathway in sepsis-induced splenic lymphocyte apoptosis** MA Tao, HAN Lu, HU Wen-quan. Department of Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China  
Corresponding author: HU Wen-quan, Email: huwq@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis signal pathway in extensive apoptosis of splenic lymphocytes in sepsis. **Methods** Twenty-four C57BL/6 mice were randomized into the cecal ligation and puncture (CLP) group and sham operation group, with 12 mice in each group. Twenty-four hours after CLP, the animals were sacrificed, and spleens were harvested for evaluation. Apoptosis was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis. The expressions of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results** High degree of lymphocyte apoptosis was observed in the CLP group. Meanwhile, marked induction of GRP78 expression was observed in the splenocytes in septic mice, indicating the motivation of the unfolded protein responses (UPR). Furthermore, both mRNA and protein levels of CHOP were highly upregulated in the CLP group, suggesting that ER stress response was switched to a pro-apoptotic response. **Conclusion** These results demonstrates activation of the ER stress response in lymphocytes and that ER stress may contribute to abnormal lymphocyte apoptosis during sepsis.

**【Key words】** sepsis; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

研究表明淋巴细胞过度凋亡造成的免疫功能紊乱是脓毒症病理生理机制中的关键环节,也是影响脓毒症预后的重要参数<sup>[1-3]</sup>,但机制尚待深入研究。近年来内质网应激凋亡信号途径受到广泛关注<sup>[4-5]</sup>。作为真核细胞内最大的细胞器,内质网参与钙贮存、释放,生物大分子合成加工等重要生理过程,对内环境变化非常敏感。缺血、缺氧、ATP 耗竭、钙平衡紊乱、新合成蛋白质过多或加工障碍等均会造成内质网应激,触发内质网应激反应以拮抗应激,但过强或持续的应激超过自身代偿能力即启动凋亡程序。本

研究中采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型,分析葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的表达变化,研究内质网应激及凋亡机制在脓毒症淋巴细胞过度凋亡中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:**原位末端缺刻标记法(TUNEL)凋亡试剂盒和一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)系统均购自瑞士 Roche 公司,羊抗小鼠 GRP78 多克隆抗体(sc-1050)、兔抗小鼠 CHOP 多克隆抗体(sc-575)均购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(ma-9256)购自美国 Cell Science 公司,TRIzol Reagent RNA 分离试剂购自美国 Introgen 公司,PCR 引物由大连宝生物工程有

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.014

基金项目:天津市自然科学基金项目(05YFTJMJ14700)

作者单位:300052 天津医科大学总医院外科

通信作者:胡文全,Email:huwq@126.com

限公司合成,其他试剂均购自天津联星生物科技有限公司。

**1.2 CLP 动物模型建立及分组:**24 只 C57BL/6 小鼠购自天津医科大学实验动物中心,体重 18~25 g。按随机数字表法分为假手术(sham)组和模型(CLP)组,每组 12 只。麻醉小鼠,无菌条件下取腹正中切口,盲肠根部游离并结扎,18 号针头穿刺盲肠两次,略加挤压,制成 CLP 模型;sham 组仅开腹游离盲肠。术后 24 h 处死动物,取脾脏进行淋巴细胞凋亡检测。

**1.3 凋亡检测:**脾组织石蜡切片,常规脱蜡、水化后,用焦碳酸二乙酯水溶液处理 30 min,按试剂盒说明书进行 TUNEL 染色。随机选择 10 个高倍视野,用显微成像系统和图像分析软件获取和分析实验结果,计算平均凋亡细胞数,即凋亡指数。

**1.4 RT-PCR 检测:**采用 TRIzol 法提取总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。行一步法逆转录及扩增。引物序列为:GRP78 上游 5'-CTGGG TACAATTTGATCTGAC-3',下游 5'-GCATCCT GGTGGCTTTCCAGC-3';CHOP 上游 5'-CAGCG ACAGAGCCAGAATAAC-3',下游 5'-GACCAT CGGTGCATCAGAGCC-3';β-actin 上游 5'-GTTC GCCATGGATGACGACC-3',下游 5'-CATCACA ATGCCTGTGGTAC-3'。反应条件:55 ℃ 逆转录 30 min,94 ℃ 3 min,94 ℃ 50 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 60 s,30 个循环,72 ℃ 5 min。将 PCR 反应产物置于琼脂糖凝胶上电泳,VDS450 凝胶成像系统扫描分析,计算目的基因与 β-actin 的平均灰度值比值。

**1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测:**取小鼠脾脏组织,用裂解液进行研磨,离心后提取蛋白匀浆,Lowry 法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白质,变性后用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,移至硝酸纤维素膜,封闭后分别与兔抗鼠 GRP78、CHOP 单克隆抗体(1:500 稀释)和辣根过氧化物酶标记的抗兔多克隆抗体(1:5000 稀释)反应,增强化学发光法显色系统显色,超敏胶片曝光,以 β-actin 为内参照。VDS450 凝胶成像系统扫描测定,计算蛋白条带的灰度值。

**1.6 统计学分析:**使用 SPSS 11.5 统计软件,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,行 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 脾淋巴细胞凋亡(彩色插图图 1):**TUNEL 阳性染色信号定位于细胞核,呈棕黄色。sham 组脾脏

仅见散在阳性细胞,凋亡指数为  $5 \pm 3$ ;CLP 组脾脏可见丛集样或簇状阳性细胞,表明脾淋巴细胞存在明显凋亡,凋亡指数为  $52 \pm 17$ ,与 sham 组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.2 GRP78 和 CHOP 的表达变化(表 1;彩色插图图 2):**RT-PCR 检测结果显示,CLP 组脾脏 GRP78 和 CHOP mRNA 表达均较 sham 组明显增加,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ );Western blotting 检测结果显示,CLP 组脾脏 GRP78 和 CHOP 蛋白表达亦均较 sham 组明显增加,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。

表 1 两组小鼠脾脏 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 与蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	mRNA 表达		蛋白表达	
		GRP78	CHOP	GRP78	CHOP
sham 组	12	0.314±0.107	0.221±0.074	2.733±0.421	0.403±0.142
CLP 组	12	0.807±0.122 <sup>a</sup>	0.923±0.085 <sup>a</sup>	5.216±1.351 <sup>a</sup>	3.170±1.227 <sup>a</sup>

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

**3 讨论**

脓毒症是严重创伤、烧伤、感染和大手术后等患者的常见并发症之一,进一步恶化会导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS),是临床危重症患者的主要死亡原因。有研究表明,淋巴细胞过度凋亡造成的免疫功能紊乱是脓毒症发生发展的重要机制<sup>[1-3]</sup>。Scumpia 等<sup>[4]</sup>研究发现,CLP 模型鼠淋巴细胞大量凋亡,抑制淋巴细胞能改善免疫抑制和脓毒症预后;董宁等<sup>[5]</sup>发现烧伤导致的脓毒症也存在明显的脾淋巴细胞凋亡;林玲等<sup>[6]</sup>的临床研究表明,淋巴细胞凋亡程度与脓毒症病情相关。本研究结果也显示 CLP 小鼠脾淋巴细胞的凋亡明显增加,这些细胞以凋亡的方式大量清除,不仅使生物活性的免疫细胞数明显减少,影响 T 细胞功能、抗体产生、抗原呈递等,凋亡细胞免疫抑制效应还能进一步影响免疫功能,如诱导免疫细胞无能、辅助性 T 细胞(TH2)平衡偏移等<sup>[1-2]</sup>。

与死亡受体和线粒体介导凋亡机制不同,内质网应激凋亡信号途径是新近提出的由内质网应激损伤启动的凋亡机制。内质网是真核细胞内最大的细胞器,承载重要的生理功能,具备严格的质控系统以确保细胞生命活动的正常进行。缺血、缺氧、ATP 耗竭、钙平衡紊乱、氧化应激等均会导致内质网损伤,细胞即通过启动内质网应激反应,增加内质网伴侣蛋白表达、减少蛋白合成等维持自身稳态;但过强或持久的应激超过自身代偿能力,就会独立于经典的

凋亡机制(包括死亡受体和线粒体途径)诱导细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。研究表明内质网应激凋亡机制在糖尿病、感染性疾病及神经退行性疾病等众多疾病中均发挥重要作用<sup>[9-11]</sup>。

脓毒症病理生理过程中,创伤、烧伤、感染等应激刺激会造成机体内环境严重紊乱,氧化应激、缺血、缺氧、钙失衡等内质网损伤的诱因贯穿始终。Dear 等<sup>[12]</sup>研究发现脓毒症大鼠肝脏内质网应激相关的蛋白表达明显增加。本研究发现,脓毒症小鼠脾淋巴细胞中 GRP78 和 CHOP 的 mRNA 和蛋白表达均明显增加。GRP78 是内质网中协助蛋白质正确折叠的重要伴侣蛋白,也是内质网应激反应最终上调的靶标,被认为是内质网应激反应发生的标志分子,是增强细胞抵抗应激的能力、促使内质网稳态恢复的关键分子<sup>[13]</sup>。而 CHOP 是与内质网应激和凋亡机制密切相关的转录因子,非应激时,CHOP 在胞质低水平表达;应激时特别是内质网应激时,CHOP 表达会明显增加并发生核转位,通过抑制 Bcl-2 表达,上调 Bax 等机制诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。因此,本实验中所发现的 GRP78 和 CHOP 表达上调,不仅提示在脾淋巴细胞中存在明显内质网应激反应,还表明 CHOP 依赖凋亡机制在脾淋巴细胞过度凋亡中发挥了重要作用。

由于淋巴细胞凋亡在脓毒症病理生理机制中的重要作用,已有多项应用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)抑制剂或针对 Fas 的小干扰 RNA 等方法,针对内源性或外源性凋亡途径抑制凋亡改善脓毒症预后的研究报道<sup>[15]</sup>。本实验研究结果表明,脓毒症病理生理过程中,应激刺激作用下脾淋巴细胞中的内质网应激反应被活化以拮抗应激,但由于应激过于强烈,进而通过 CHOP 依赖机制诱导脾淋巴细胞凋亡,提示内质网应激凋亡机制在脓毒症淋巴细胞凋亡中发挥重要作用,并可能成为纠正淋巴细胞过度凋亡治疗脓毒症的新着眼点。

参考文献

- [1] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003, 348(2):138-150.
- [2] Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, 2007, 170(5):1435-1444.
- [3] 董月青, 黄军华, 姚咏明. 脓毒症中 T 淋巴细胞凋亡及其调控研究进展. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(6):381-384.
- [4] Scumpia PO, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. Treatment with G1TR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood*, 2007, 110(10):3673-3681.
- [5] 董宁, 姚咏明, 董月青, 等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖及凋亡影响. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(7):393-396.
- [6] 林玲, 蔡秀军, 潘孔寒. 外科危重病患者外周血淋巴细胞凋亡与预后的关系. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(1):25-27.
- [7] Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ*, 2006, 13(3):363-373.
- [8] 关丽英, 许彩民, 潘华珍. 内质网应激介导的细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(11):1136-1141.
- [9] Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(11):813-822.
- [10] Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, et al. Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet*, 2005, 37(9):974-979.
- [11] Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*, 2002, 7(4):335-345.
- [12] Dear JW, Leelahavanichkul A, Aponte A, et al. Liver proteomics for therapeutic drug discovery; inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure. *Crit Care Med*, 2007, 35(10):2319-2328.
- [13] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program; role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*, 2002, 514(2-3):122-128.
- [14] Kim R, Emi M, Tanabe K, et al. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*, 2006, 11(1):5-13.
- [15] Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, et al. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(4):493-500.

(收稿日期:2008-11-03 修回日期:2008-12-05)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克患者的中性粒细胞与外周血单核细胞具有不同的 Toll 样受体信号调节通路

巴西学者对重症监护病房(ICU)中脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克患者进行分组,采用实时聚合酶链反应检测外周血单核细胞和中性粒细胞,通过比较组间基因变化,基因折叠变化大于 2 个,并有明显的染色体单体双键改变的,视作不同表达。结果发现,外周血单核细胞的 Toll 样受体(TLR)信号通路在脓毒症不同时期呈动态改变,在脓毒症加重时下调,且只在 5 个下调基因中发现有不同的基因表达;而中性粒细胞则在所有观察到的功能区中,都具有广泛的基因上调,并在疾病的所有阶段都存在这种变化。研究者认为,TLR 信号通路在脓毒症患者的外周血单核细胞和中性粒细胞具有不同的基因调节,且这种调节在脓毒症不同阶段呈动态改变。

王瑞晨,编译自《Crit Care Med》,2008-11-28(电子版);胡森,审核

## 菌毒炎并治对脓毒症大鼠模型影响的肝基因芯片研究

(正文见44页)

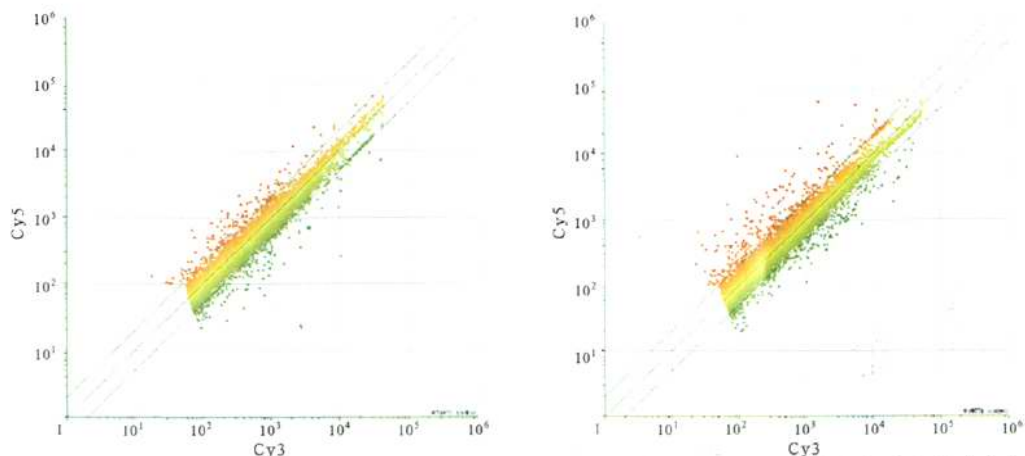


图1 模型组(左)大鼠基因表达谱散点图中黄点表示该基因在正常对照组和模型组中表达无差异,红点代表该基因在模型组中表达明显高于正常对照组(上调),绿点代表该基因在模型组中表达明显低于正常对照组(下调),菌毒炎并治(右)大鼠基因表达谱散点图中黄点代表该基因在模型组和治疗组中表达无差异,红点代表该基因在治疗组中表达明显高于模型组(上调),绿点代表该基因在治疗组中表达明显低于模型组(下调)

## 内质网应激凋亡信号途径在脓毒症脾淋巴细胞凋亡中的作用研究

(正文见48页)

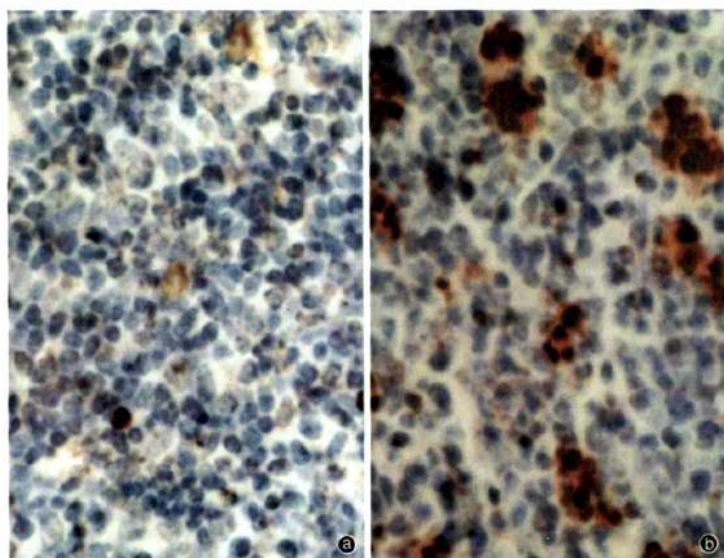


图4 TUNEL染色阳性细胞的细胞核呈棕黄色,显微镜下观察sham组(a)脾脏仅见散在阳性细胞,CLP组(b)脾脏可见丛集样或簇状阳性细胞 TUNEL  $\times 100$

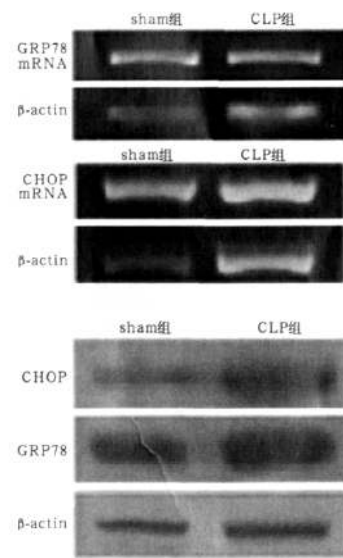


图2 RT-PCR(上)和Western blotting(下)检测CLP组小鼠脾脏GRP78和CHOP的mRNA及蛋白表达均较sham组增强

## 大鼠高温热疗模型的建立与评价

(正文见51页)

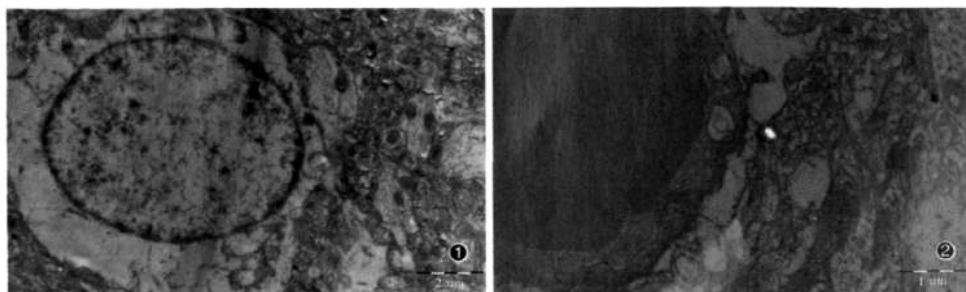


图1 Mb组大鼠神经元胞体水肿严重,胞质变空 钡-铅双染  $\times 12\ 000$  图2 Mb组大鼠血脑屏障中内皮细胞中有空泡形成,胶质细胞足板肿胀 钡-铅双染  $\times 25\ 000$