

# 提高内质网应激在脓毒症中作用和意义的认识

姚咏明 祝筱梅

严重烧伤、创伤及外科大手术等急性损伤后常伴有炎症反应及并发感染,进一步发展可导致脓毒症(sepsis)、脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS),是临床危重患者最主要的死亡原因之一。机体免疫功能紊乱在脓毒症及 MODS 发生发展及转归中的作用已受到国内外学者的广泛关注,是目前研究的热点问题之一。严重创伤、休克及脓毒症可以迅速引起机体的应激反应,细胞内稳态被打乱导致内质网功能状态的改变,通过相应信号通路,引发细胞内一系列反应,称为内质网应激(ERS)。诸多资料提示,ERS 持续时间及应激水平对于应激细胞的功能与生存均具有重要影响,决定了应激细胞适应、损伤或凋亡的发生发展<sup>[1]</sup>,并参与了机体免疫功能状态的调节过程。

## 1 内质网与 ERS

内质网是真核细胞中最重要的细胞器之一,是细胞质中由内膜构成的一个封闭的网状管道系统,外与细胞膜相连,内与核膜的外膜相通,具有高度多型性。内质网能有效增加细胞内的膜面积,在内质网膜上附有多种酶,为生命活动过程中各种化学反应的正常进行创造有利条件。内质网的主要生理功能包括蛋白质合成、修饰、加工及脂类、糖类代谢和  $Ca^{2+}$  平衡等,其功能状态对维持细胞内稳态、促进细胞抵抗或适应各种应激刺激具有重要意义。内质网对细胞内外环境的改变非常敏感,缺血、缺氧、三磷酸腺苷(ATP)耗竭、 $Ca^{2+}$  平衡紊乱、新合成蛋白质异常增多或加工、修饰、转运障碍等,均可造成内质网功能失调,即 ERS。内质网稳态被打乱后最终会导致大量错误或者未折叠蛋白质在内质网腔内聚集,激活共同的应激反应,即未折叠蛋白反应(UPR)。ERS 是真核细胞中普遍存在的一种应激反应,适当的 ERS 反应对细胞功能状态及存活至关重要,一定程度的 ERS 可提高内质网处理未折叠蛋白的能力,减轻内质网负荷,促进其稳态的恢复,增强细胞适应和抵抗应激的能力。刺激因素持续存在或过强时,内质网功能不能及时恢复稳态,内质网相关性细胞凋亡可协助促进功能障碍细胞的清除。

## 2 ERS 信号转导途径

ERS 时内质网腔内蛋白不能正确折叠而被大量滞留,导致 UPR,激发内质网与高尔基体、细胞核之间的信号转导,抑制蛋白质合成并启动 ERS 相关基因转录。在哺乳动物中,存在 3 种关键的内质网跨膜蛋白[需肌醇酶 1(IRE1)、双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、转录激活因子 6(ATF6)]以感受内质网腔内微环境变化;正常情况下,这 3 种蛋白的内质网腔内侧都与糖调节蛋白 78(GRP78,又称 GRP78/BIP)结合而处于无活性状态。内质网腔内未折叠或错误折叠蛋白大量聚集时,GRP78 与 IRE1、PERK、ATF6 解离,转而去结合未折叠蛋白。研究提示,解离后的感受蛋白被活化并启动 UPR,主要通过 IRE1-X-盒结合蛋白-1(XBP-1)路径、ATF6 路径和 PERK-真核翻译起始因子 2 磷酸化-ATF4 路径将信息传入核内,降低未折叠或错误折叠蛋白在内质网内的积累,上调 ERS 相关基因转录。恢复内质网的生理功能是一个促生存响应。但是,当严重或长时间 ERS 损伤了内质网的功能时,这些信号通路同样能启动 ERS 所介导的凋亡途径,通过激活下游的凋亡信号分子,如 CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP/GADD153)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)以及 Bcl-2 家族等诱导细胞凋亡。

## 3 ERS 对脓毒症免疫反应的影响

当机体遭受严重烧伤、创伤等急性打击后,加之伤后疼痛、失血、失液、感染、休克等刺激因素,使得整个机体处于严重的应激状态,内环境稳态破坏,激发 ERS 反应的发生。适当的 ERS 反应对细胞功能状态及存活至关重要,一定程度的 ERS 可提高内质网处理未折叠蛋白的能力,促进其稳态的恢复,增强细胞适应和抵抗应激的能力;但当刺激因素持续存在或过强时,细胞内稳态不能及时恢复或重建,ERS 将激活内质网相关

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.09.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872683,30800437);国家重点基础研究发展计划项目(2005CB522602)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所

性细胞凋亡途径诱导细胞凋亡,ERS 对炎症反应和细胞免疫功能状态具有重要影响。

**3.1 ERS 与树突细胞(DC):**DC 是机体免疫系统的重要调节细胞,具有广泛的生物学效应,包括激活天然免疫系统,启动更持久的适应性免疫,诱导胸腺清除自身反应性 T 细胞,分化调节性 T 细胞,维持自身耐受等。DC 感受到各种病原体刺激后可分化成熟,细胞因子分泌增多,抗原呈递能力增强,对 T 细胞增殖分化促进能力增强。DC 功能状态的显著变化使其处于明显的应激状态下,常需耐受氨基酸耗竭、氧化应激等刺激。对多种细胞来说,这些刺激可能引起细胞内蛋白表达停止而诱发细胞凋亡,但在 DC 等免疫细胞中存在一套不同的应激耐受机制,以利于在各种不良环境下细胞功能的生存,该应激耐受机制包括总体蛋白合成抑制及特殊基因转录增强等,均与 ERS 反应有密切关系。据报道,生理条件下 ERS 反应对 DC 分化发育及存活至关重要<sup>[2]</sup>,将哺乳动物细胞 ERS 信号转导过程中关键调节分子 XBP-1 基因敲除后,小鼠髓系及淋巴系 DC 的数量均明显减少,分泌物降低;而将 XBP-1 活性片段导入 DC 中则可促进其分化发育。我们新近的研究表明,ERS 是 DC 免疫调节机制的重要分子基础,DC 在受到免疫调节因子作用后分化成熟与 ERS 密切相关,诱导 XBP-1 基因沉默 DC 的成熟分化明显受抑,分泌功能降低,表面共刺激分子表达下调,介导 T 细胞增殖及功能极化的功能也明显受抑。

**3.2 ERS 与 T 细胞:**T 细胞是淋巴细胞的主要成员,具有多种生物学效应,T 细胞增殖活化过程中伴有明显的 ERS 反应发生。有资料显示,急性感染或白细胞介素-2(IL-2)信号途径激活可明显上调人外周血单个核细胞及小鼠 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞中 XBP-1 基因表达,且人为维持 IRE1/XBP-1 信号途径的活化状态显著延长持续 ERS 细胞的生存时间<sup>[3]</sup>,对细胞存活具有重要决定意义。众所周知,T 细胞被特异性抗原激活后可增殖分化,形成在功能上各异的两类细胞,即 T 免疫效应细胞和 T 记忆细胞;这些记忆细胞会在体内长久保存,并在下一次遇到同样抗原时激发一种继发反应,引起更强烈的细胞增殖,在短时间内形成大量的效应 T 细胞,但目前对于免疫记忆系统的详细机制尚无深入了解。新近研究表明,ERS 反应及其调控可能是效应 T 细胞终末分化的重要机制<sup>[4]</sup>。XBP-1 的活化对决定效应 T 细胞终末分化的杀伤细胞凝集素样受体 G1 (KLRG1)表达有着重要调节作用,但对急性感染 5 d 后的效应 CD8<sup>+</sup>T 细胞来说,高表达 XBP-1 活性片段并不能诱导其 KLRG1 表达增强。提示 IRE1/XBP-1 信号途径的激活对 CD8<sup>+</sup>T 细胞终末分化意义重大,但却无法逆转其分化方向。

**3.3 ERS 与浆细胞:**B 细胞是参与机体内液免疫的主要细胞,ERS 在 B 细胞免疫应答过程中的重要性已得到广泛认知,内毒素刺激 B 细胞增殖分化过程中伴有内质网伴侣分子 GRP78、GRP94 等表达及 XBP-1 转录水平的明显上调;转录因子 XBP-1 的激活对浆细胞终末分化及合成、分泌免疫球蛋白至关重要,而且是必需的。体内实验也证实,小鼠淋巴组织 XBP-1 缺失仍能进行正常的 B 细胞活化增殖、细胞因子分泌等,但因浆细胞不能正常分化可使免疫球蛋白分泌明显受抑<sup>[5]</sup>。既往认为,这可能是 B 细胞活化时免疫球蛋白大量合成及其在内质网腔内聚集刺激了 ERS 反应的发生,但采用内毒素刺激 B 细胞株 CH12 时发现,在抗体合成增加之前即有 GRP78、GRP94 表达增加及 XBP-1 活化,提示生理性 ERS 参与了启动 B 细胞分化成熟过程<sup>[6]</sup>。

**3.4 过度 ERS 介导免疫细胞凋亡:**近年来研究表明,除死亡受体活化和线粒体损伤两条经典细胞凋亡通路外,过度 ERS 可启动细胞凋亡,是一条新的细胞凋亡信号转导途径;该信号通路包括 UPR 和 Ca<sup>2+</sup>起始信号等机制,通过特异性激活 caspase-12/caspase-3、p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)/CHOP 等信号分子,最终导致细胞凋亡。脓毒症病理过程中,大量淋巴细胞凋亡被认为是诱发 T 细胞克隆无反应状态的主要原因,与脓毒症高病死率密切相关,抑制 DC 和淋巴细胞的凋亡能明显提高感染动物的生存率<sup>[7]</sup>。ERS 持续存在或过强时启动细胞凋亡程序,对炎症反应的恶化和感染的发生发展至关重要<sup>[8]</sup>。有资料显示,内毒素体外刺激巨噬细胞早期即可诱导明显的 ERS,但对 ERS 相关细胞凋亡途径的关键分子 CHOP 表达无明显诱导效应,仅在后期(24 h)稍有上调,但无明显细胞凋亡。值得注意的是,经内毒素短时间(5 h)预处理可明显减轻 ERS 特异诱导剂所致的细胞凋亡<sup>[9]</sup>,进一步提示适度 ERS 有利于促进内质网功能稳态恢复以减轻细胞损伤和细胞凋亡的发生。有鉴于此,在脓毒症早期对 ERS 进行适当调控以防止其反应过度,或在后期对 ERS 诱导的细胞凋亡实施有效干预,很有可能为脓毒症的临床防治带来新的希望。

#### 4 干预 ERS 在脓毒症防治中的可能价值

严重创(烧)伤、休克并发脓毒症、MODS 是临床危重患者最主要的死亡原因之一,临床缺乏有效的预防

与治疗措施。随着对脓毒症病理生理过程及感染免疫分子机制认识的不断深入,人们对ERS在机体炎症反应中的作用有了初步了解,ERS对炎症反应和免疫细胞功能状态的影响在严重创(烧)伤及其感染并发症的发生发展中具有重要意义<sup>[10]</sup>,能否通过调控ERS反应及炎症效应寻找有效的治疗靶点成为人们关注的焦点问题。

晚近的资料显示,保存或重建内质网功能稳态可能是寻求有效治疗措施的重要靶标。例如,Salubrinal(一种磷酸酶抑制剂)可选择性抑制真核翻译起始因子2去磷酸化,减轻内质网中蛋白负荷,从而减轻ERS反应程度并保护细胞抵抗ERS诱导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>。我们的体外实验结果提示,干扰IRE1/XBP-1信号途径的过度活化可有效调控重要抗原呈递细胞DC的功能状态。此外,针对ERS诱导细胞凋亡信号途径中关键分子的特异性抑制剂可显著干扰细胞凋亡的发生<sup>[12]</sup>,并减轻过度ERS所致组织细胞损伤。当然,ERS信号途径在介导机体免疫及炎症反应中的临床意义尚有待深入研究,进一步探讨ERS在脓毒症病理过程中的确切地位和调控环节将为寻求有效的干预措施提供新思路。

### 参考文献

- [1] Aridor M, Balch WE. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med*, 1999, 5: 745-751.
- [2] Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med*, 2007, 204: 2267-2275.
- [3] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, 2007, 318: 944-949.
- [4] Kamimura D, Bevan MJ. Endoplasmic reticulum stress regulator XBP-1 contributes to effector CD8<sup>+</sup> T cell differentiation during acute infection. *J Immunol*, 2008, 181: 5433-5441.
- [5] Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, et al. XBP-1 specifically promotes IgM synthesis and secretion, but is dispensable for degradation of glycoproteins in primary B cells. *J Exp Med*, 2005, 202: 505-516.
- [6] Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 49047-49051.
- [7] Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, et al. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxin shock. *J Immunol*, 2008, 180: 6941-6946.
- [8] Suyama K, Ohmuraya M, Hirota M, et al. C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of experimental pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367: 176-182.
- [9] Nakayama Y, Endo M, Tsukano H, et al. Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J Biochem*, 2010, 147: 471-483.
- [10] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 2008, 454: 455-462.
- [11] Boyce M, Bryant KF, Jousse C, et al. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, 2005, 307: 935-939.
- [12] Kim I, Shu CW, Xu W, et al. Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of ASK1. *J Biol Chem*, 2009, 284: 1593-1603.

(收稿日期: 2010-07-21)

(本文编辑: 李银平)

### • 科研新闻速递 •

#### 毒扁豆碱可抑制延迟复苏时乙醇中毒大鼠的器官损害

美国科研人员已经证实急性乙醇中毒并发失血性休克时交感神经的激活发挥了重要作用,立即应用胆碱酯酶抑制剂可在急性乙醇中毒并发失血性休克时避免神经细胞损伤及血压降低。由此假设应用胆碱酯酶抑制剂可以升高平均动脉压(MAP),抑制延迟复苏引起的器官功能损害。研究人员在雄性SD大鼠失血性休克(MAP 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)持续 60 min)之前进行预处理,分别给予乙醇(2.5 g/kg 或 0.3 g·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>持续 15 h)或等量葡萄糖之后立即或在 60 min 内给予林格液或毒扁豆碱林格液(100  $\mu$ g/kg)进行复苏。林格液可使葡萄糖休克组 MAP 升高,而急性乙醇中毒组 MAP 升高相对迟缓。延迟给予林格液并不能更好地提升葡萄糖休克组和急性乙醇中毒组的 MAP。在立即或延迟给予毒扁豆碱林格液时均可明显提高葡萄糖休克组和急性乙醇中毒组的 MAP。在葡萄糖休克组立即或延迟给予林格液或毒扁豆碱林格液时丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)无明显差异。急性乙醇中毒组 ALT 增高,立即给予毒扁豆碱林格液时 ALT 降低,若延迟给予毒扁豆碱林格液组织损害将加重。总之,毒扁豆碱升高血压的作用不依赖于用药时间及急性乙醇中毒的存在与否,然而在急性乙醇中毒并发失血性休克时延迟给药将增加器官损害及功能障碍。以上结果显示,在急性乙醇中毒时采取合理的复苏手段可减轻灌注引起的组织损害。

韩晓春, 编译自《Shock》, 2010-06-22(电子版); 胡森, 审校