

脓毒症淋巴细胞凋亡和内质网应激状态 以及与预后关系的研究

马少林 邵蕾 刘杨 李占霞 叶海燕 陆华君 张常晶 朱晓萍

【摘要】目的 探讨淋巴细胞凋亡和内质网应激途径在脓毒症发生中的作用及其与预后的关系。**方法** 采用前瞻性队列研究方法,选择2012年1月至2014年4月同济大学附属东方医院急诊重症加强治疗病房(ICU)住院治疗的脓毒症患者共70例,于入ICU后1、3和7d取外周血,采用流式细胞仪检测外周血淋巴细胞凋亡率,采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测内质网特异性葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和核转录因子CHOP的mRNA表达。采用Spearman相关分析CHOP mRNA表达与外周血淋巴细胞凋亡率的相关性。根据患者28d预后分为死亡组(23例)和生存组(47例);选取同期20例健康志愿者作为健康对照组。**结果** ①淋巴细胞凋亡率:与健康对照组[(2.86±0.66)%]比较,脓毒症生存组和死亡组患者入ICU 1、3、7d外周血淋巴细胞凋亡率均明显升高[生存组分别为(12.44±4.43)%、(8.57±3.38)%、(6.78±3.35)%,死亡组分别为(14.42±2.01)%、(11.32±2.53)%、(8.87±3.62)%,均 $P<0.01$],以1d时升高最为显著,随后逐渐下降;生存组与死亡组1d时差异无统计学意义,但3d、7d时生存组较死亡组明显降低(均 $P<0.05$)。②CHOP mRNA表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$):与健康对照组[(2.56±1.09)×10⁻³]比较,脓毒症生存组和死亡组患者入ICU 1、3、7d CHOP mRNA表达水平均明显升高[生存组分别为(5.83±1.96)×10⁻³、(4.24±1.60)×10⁻³、(4.15±1.64)×10⁻³,死亡组分别为(37.20±20.70)×10⁻³、(18.80±13.90)×10⁻³、(9.28±7.78)×10⁻³,均 $P<0.01$];虽然死亡组入ICU 1、3、7d较生存组分别升高了6.38、4.43、2.24倍(P 值分别为0.000、0.000、0.001),但下降也较迅速。③GRP78 mRNA表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$):与健康对照组[(3.31±2.04)×10⁻³]比较,脓毒症生存组和死亡组患者入ICU 1d时GRP78 mRNA表达即明显升高[(5.83±2.00)×10⁻³、(11.30±6.48)×10⁻³,均 $P<0.01$],随后逐渐下降;入ICU 3d、7d时,生存组已降至健康对照组水平[3d:(3.99±1.60)×10⁻³,7d:(3.30±1.35)×10⁻³,均 $P>0.05$],而死亡组GRP78 mRNA表达虽逐步下降,但仍显著高于健康对照组[3d:(7.27±3.64)×10⁻³,7d:(5.23±1.94)×10⁻³,均 $P<0.01$]。④Spearman相关分析:脓毒症患者外周血CHOP mRNA表达水平与外周血淋巴细胞凋亡率呈显著正相关($r=0.414$, $P=0.000$)。**结论** 淋巴细胞凋亡增加和内质网应激途径被活化在脓毒症发生发展中发挥了作用,并与预后相关。

【关键词】 细胞凋亡; 淋巴细胞; 预后; 脓毒症; 内质网应激

A study of lymphocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the development of sepsis and their association with outcome in septic patients Ma Shaolin*, Shao Lei, Liu Yang, Li Zhanxia, Ye Haiyan, Lu Huajun, Zhang Changjing, Zhu Xiaoping. *Department of Intensive Care Unit, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Corresponding author: Zhu Xiaoping, Email: z_xping@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of lymphocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress (ERS) on the development of sepsis and their association with the prognosis of sepsis patients. **Methods** A prospective cohort study was conducted. Seventy septic patients admitted to intensive care unit (ICU) of Shanghai East Hospital of Tongji University were enrolled. Blood samples were collected on days 1, 3 and 7 to measure percentage of circulating apoptotic lymphocyte with flow cytometry analysis. The relative expressions of endoplasmic reticulum specific glucose regulated protein 78 (GRP78) mRNA and transcription factor CHOP mRNA were measured by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlation between CHOP mRNA expression and percentage of circulating apoptotic lymphocyte was analyzed by Spearman relative analysis. The patients were divided into death

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.008

基金项目:上海市浦东新区医药卫生科技发展专项(PW2011A-06)

作者单位:200120上海,同济大学附属东方医院ICU(马少林、刘杨、李占霞、叶海燕、陆华君、张常晶),呼吸内科(朱晓萍);200092上海,同济大学医学院研究生院(邵蕾)

通讯作者:朱晓萍, Email: z_xping@hotmail.com

($n = 23$) and survival subgroups ($n = 47$). Twenty healthy volunteers during the same period were selected as the healthy control group. **Results** ① Rate of lymphocyte apoptosis: compared with healthy control group [(2.86 ± 0.66)%], septic patients, either survival or death subgroup, exhibited higher rate of lymphocyte apoptosis on days 1, 3 and 7 [survival subgroup: (12.44 ± 4.43)%, (8.57 ± 3.38)%, (6.78 ± 3.35)%; death subgroup: (14.42 ± 2.01)%, (11.32 ± 2.53)%, (8.87 ± 3.62)%, all $P < 0.01$], and it was obvious on day 1, and the phenomenon became less marked gradually. The rate of circulating apoptotic lymphocytes did not differ between the death and survival subgroups on day 1, but there was a significant difference in the rate on day 3 and day 7 (both $P < 0.05$). ② The expression of CHOP mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): compared with that in healthy controls [(2.56 ± 1.09) × 10⁻³], CHOP mRNA expression was increased on days 1, 3 and 7 in septic patients [survival subgroup: (5.83 ± 1.96) × 10⁻³, (4.24 ± 1.60) × 10⁻³, (4.15 ± 1.64) × 10⁻³, death subgroup: (37.20 ± 20.70) × 10⁻³, (18.80 ± 13.90) × 10⁻³, (9.28 ± 7.78) × 10⁻³, all $P < 0.01$], and it was more obvious in the death subgroup, as it was increased by 6.38, 4.43, and 2.24 folds (P values was 0.000, 0.000, and 0.001), but it decreased rapidly in death subgroup. ③ The expression of GRP78 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): compared with healthy controls [(3.31 ± 2.04) × 10⁻³], the expression of GRP78 mRNA in both survival and death subgroups increased in septic patients on day 1 [(5.83 ± 2.00) × 10⁻³, (11.30 ± 6.48) × 10⁻³, both $P < 0.01$], and they decreased subsequently. The expression of GRP78 mRNA in the survival subgroup declined to the levels of the healthy control group on day 3 and day 7 [3 days: (3.99 ± 1.60) × 10⁻³, 7 days: (3.30 ± 1.35) × 10⁻³, both $P > 0.05$], and GRP78 mRNA expression in the death subgroup was gradually lowered, but it was still higher than that in the healthy control group [3 days: (7.27 ± 3.64) × 10⁻³, 7 days: (5.23 ± 1.94) × 10⁻³, both $P < 0.01$]. ④ Spearman relative analysis showed that the expression of CHOP mRNA was positively correlated with the rate of lymphocyte apoptosis ($r = 0.414$, $P = 0.000$). **Conclusion** The increase in the rate of lymphocyte apoptosis and activation of ERS play an important role in the development of sepsis, and it is associated with worse outcome in the septic patients.

【Key words】 Apoptosis; Lymphocyte; Prognosis; Sepsis; Endoplasmic reticulum stress

脓毒症是病原微生物引起的全身炎症反应综合征 (SIRS), 病死率至今居高不下^[1-2]。近年来, 很多证据证明了免疫细胞凋亡引起的免疫抑制在脓毒症发病机制中的重要地位。Hotchkiss 等^[3]对脓毒症死亡患者进行病理解剖发现, 其免疫细胞凋亡明显, 包括 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞以及树突细胞。而且, 在脓毒症中多种细胞凋亡途径均被激活, 其中包括内质网应激引起的未折叠蛋白反应 (UPR)。内质网应激是指病理状态下其蛋白折叠负荷与处理能力失衡, 使得未折叠及错误折叠蛋白积聚于内质网腔, 从而激活 UPR, 改变转录、翻译程序, 以保持内质网内环境的稳定, 具有细胞保护作用^[4]。内质网特异性伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 在应激状态下转录活性增加, 与内质网跨膜蛋白感受器由结合状态转为解离状态, 参与 UPR 的启动与调节^[5]。但是, 如果内质网应激持续存在, 内环境稳态难以恢复, UPR 的促细胞凋亡作用将大于其保护作用^[6]。核转录因子 CHOP 是其中重要的靶向转录调节因子, 它能诱导多种促凋亡因子表达 (包括 DR5、TRB3、BIM 及 GADD34), 研究表明, 敲除 CHOP 基因能保护内质网应激引起的细胞凋亡^[4]。因此, 本研究通过测定脓症患者外周血淋巴细胞凋亡率、GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达及其之间的相关性, 明确内质网应激和淋巴细胞凋亡在脓毒症发生机制

中的作用, 通过观察死亡组与生存组间上述指标变化, 探讨内质网应激、淋巴细胞凋亡与预后的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象: 采用前瞻性队列研究方法, 选择 2012 年 1 月至 2014 年 4 月同济大学附属东方医院急诊重症加强治疗病房 (ICU) 住院治疗的脓症患者为研究对象, 诊断符合 2001 年危重病医学会 / 美国胸科医师协会 (SCCM/ACCP) 提出的脓毒症诊断标准^[7]。排除年龄 < 18 周岁、急性冠脉综合征、急性脑梗死以及肿瘤患者。在所有符合入选标准的脓症患者中, 剔除未完成所有时间点指标评估以及中途退出研究的患者。最终共有 70 例脓症患者完成整个研究, 其中男性 43 例, 女性 27 例; 年龄 19 ~ 94 岁, 平均 (72.5 ± 13.4) 岁。

选择同期健康志愿者 20 例作为健康对照组, 其中男性 12 例, 女性 8 例; 年龄 21 ~ 75 岁, 平均 (51.8 ± 15.1) 岁。

本研究通过同济大学附属东方医院伦理委员会批准, 均获得患者的知情同意。

1.2 临床资料记录及标本采集: 记录患者的年龄、性别、感染部位, 急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分以及 28 d 病死率。在患者入 ICU 后 1、3、7 d 分别采集外周静脉血 5 mL, 离心收集血清, 并用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,

置于 -80 °C 深低温冰箱保存待测。抽取健康志愿者外周静脉血以相同的方法检测。

1.2.1 外周血淋巴细胞凋亡率测定:取脓毒症患者及健康者外周血 2 mL, 立即送实验室用流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡率。

1.2.2 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测淋巴细胞 CHOP、GRP78 的 mRNA 表达:取分离后的淋巴细胞, 用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 1×10^6 /mL, 加入植物血凝素 (终浓度 10 μ g/mL), 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h。取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 /mL。收集各组细胞, 用 TRIzol 法提取总 RNA, 取 5 μ g RNA 进行反转录及扩增, 引物由上海代轩生物科技有限公司设计, 美国 Invitrogen 公司合成。GRP78 引物序列 (86 bp): 上游 5'-AAAGAAACCGCTGAGGCTTAT-3', 下游 5'-CCGTAGGCTCGTTGATGAT-3'; CHOP 引物序列 (151 bp): 上游 5'-ATTGACCGAATGGTGAATCTG-3', 下游 5'-TCTGGGAAAGGTGGGTAGTGT-3'; β -肌动蛋白 (β -actin) 引物序列: 上游 5'-AAGGTGACAGCAGTCGGTT-3', 下游 5'-TGTGTGGACTTGGAGAGG-3'。反应条件为 95 °C 30 s、95 °C 15 s、60 °C 30 s, 40 个循环; 为了确定扩增特异性, PCR 反应产物均经过溶解曲线分析后再进行琼脂糖凝胶电泳, 最后以 β -actin 为内参, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行线性比较^[8]。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组独立样本及所有成对样本间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验, 两相关样本间比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验, 两独立样本间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 组间分类变量资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验; 两变量相关性分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况 (表 1):根据 28 d 预后将 70 例脓毒症患者分为生存组和死亡组, 两组性别构成、年龄及感染部位等资料比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 但死亡组入院时 APACHE II 评分明显高于生存组 ($P < 0.01$)。

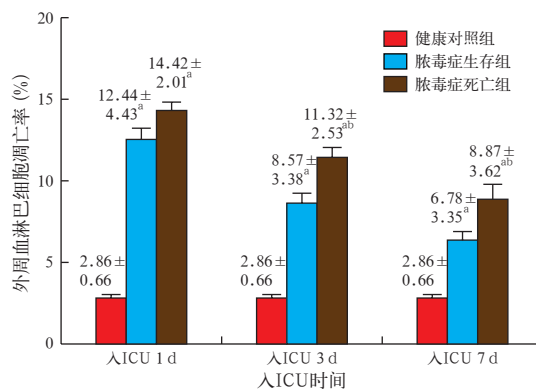
2.2 各组外周血淋巴细胞凋亡率的比较 (图 1):生存组和死亡组患者入 ICU 1、3、7 d 外周血淋巴细胞凋亡率均明显高于健康对照组 (均 $P < 0.01$), 以入 ICU 1 d 时为甚, 随后逐步下降。生存组入 ICU

表 1 不同预后两组脓毒症患者入 ICU 时基线资料比较

组别	例数 (例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	APACHE II (分, $\bar{x} \pm s$)	感染部位 (例)				
	男性	女性			肺	胆道	腹腔	其他	
生存组	47	28	19	70.2 \pm 14.0	26.68 \pm 5.54	23	10	8	6
死亡组	23	15	8	76.4 \pm 8.7	30.87 \pm 4.97	8	4	8	3
检验值	$\chi^2 = 0.208$		$Z = 1.917$	$Z = 3.065$					
<i>P</i> 值	0.649		0.055	0.002	0.404				

注: ICU 为重症加强治疗病房, APACHE II 为急性生理学与慢性健康状况评分系统 II; 空白代表无此项

1 d 时外周血淋巴细胞凋亡率与死亡组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 3 d、7 d 则明显低于死亡组 (均 $P < 0.05$)。生存组 3 d 时较 1 d 时外周血淋巴细胞凋亡率下降百分比高于死亡组 [(32.24 \pm 16.06) % 比 (21.73 \pm 12.77) % , $Z = -2.569$, $P = 0.010$]。

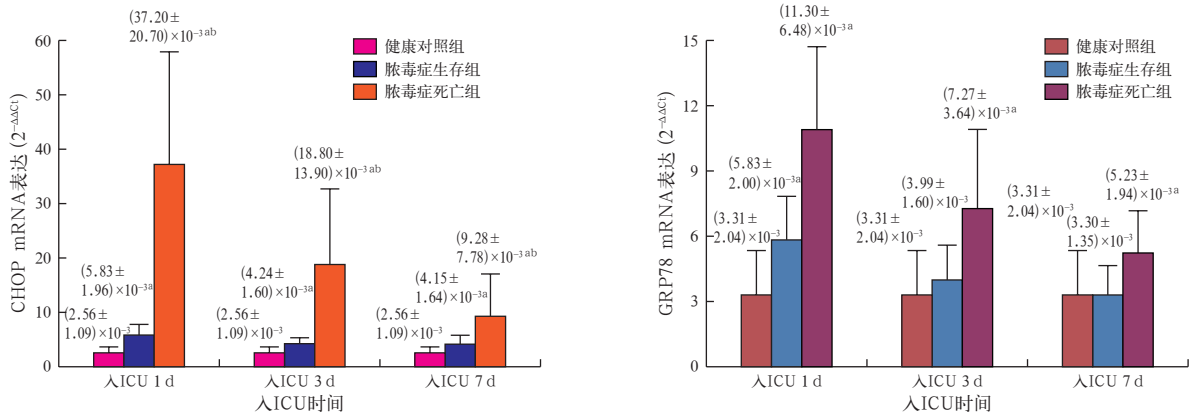


注: ICU 为重症加强治疗病房; 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与脓毒症生存组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 不同预后两组脓毒症患者和健康对照者之间外周血淋巴细胞凋亡率的变化比较

2.3 各组外周血 CHOP mRNA 表达的比较 (图 2):生存组和死亡组患者入 ICU 各时间点外周血 CHOP mRNA 表达均明显高于健康对照组 (均 $P < 0.01$), 并于 1 d 时达高峰, 然后呈时序性下降; 其中死亡组 CHOP mRNA 表达随时间的延长呈下降趋势, 但 1、3、7 d 分别较生存组升高了 6.38、4.43、2.24 倍 (P 值分别为 0.000、0.000、0.001)。生存组 3 d 时 CHOP mRNA 表达水平与 7 d 时比较差异无统计学意义 ($Z = -0.292$, $P = 0.770$)。

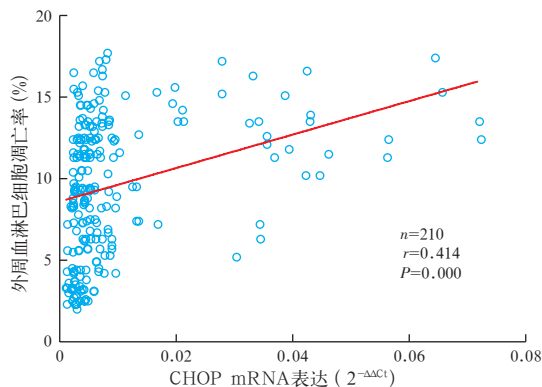
2.4 各组外周血 GRP78 mRNA 表达的比较 (图 2):生存组和死亡组患者入 ICU 1 d 时外周血 GRP78 mRNA 表达较健康对照组分别升高了 1.76 倍和 3.41 倍 (均 $P < 0.01$); 生存组入 ICU 3 d、7 d 时 GRP78 mRNA 表达略高于健康对照组, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 而死亡组 GRP78 mRNA 表达水平虽逐步下降, 但仍显著高于健康对照组 (均 $P < 0.01$)。



注: RT-PCR 为反转录-聚合酶链反应, CHOP 为核转录因子, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, ICU 为重症加强治疗病房; 与健康对照组比较, ^a*P*<0.01; 与脓毒症生存组比较, ^b*P*<0.01

图 2 RT-PCR 检测不同预后两组脓毒症患者和健康对照者外周血 CHOP、GRP78 的 mRNA 表达的变化比较

2.5 外周血 CHOP mRNA 表达与淋巴细胞凋亡率的相关性 (图 3):脓毒症患者外周血 CHOP mRNA 表达水平与淋巴细胞凋亡率呈显著正相关 ($r=0.414, P=0.000$)。



注: CHOP 为核转录因子
图 3 脓毒症患者外周血 CHOP mRNA 表达水平与淋巴细胞凋亡率的相关性

3 讨论

本研究发现,脓毒症患者发病后外周血淋巴细胞凋亡率快速升高,随后逐渐下降,但死亡组下降幅度小于生存组;死亡组内质网应激相关性转录因子 CHOP mRNA 表达水平显著升高并快速下降,而特异性伴侣蛋白 GRP78 mRNA 表达水平持续升高;生存组 GRP78 mRNA 短暂升高;相关性分析显示,脓毒症患者 CHOP mRNA 表达水平与外周血淋巴细胞凋亡率呈正相关。提示淋巴细胞凋亡增加和内质网应激途径被激活在脓毒症发生机制中发挥了作用,并与预后相关,内质网应激途径可能是促使淋巴细胞凋亡的机制之一。

本研究显示,脓毒症患者入 ICU 1 d 起外周血

淋巴细胞凋亡率即达高水平;无论生存组还是死亡组患者,虽然淋巴细胞凋亡率呈时序性下降,但 7 d 时仍保持高水平,这些提示脓毒症初期,细胞凋亡信号通路即被激活且淋巴细胞凋亡持续存在,与既往的研究结果一致^[9-10]。研究显示,用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症鼠模型后 4 h,小鼠胸腺组织中淋巴细胞凋亡即出现^[9]。另一项研究报道,脓毒性休克组 1 d 时外周血淋巴细胞凋亡率是对照组的 5 倍,是脓毒症非休克组的 2 倍,两组患者 6 d 时淋巴细胞凋亡率仍高于对照组^[10]。

本研究还发现,脓毒症死亡组患者淋巴细胞凋亡率下降幅度明显小于生存组。虽然本研究缺乏直接的证据证明高淋巴细胞凋亡率与预后不佳相关,但既往研究已证实这一推测。Drewry 等^[11]对 335 例脓毒症患者进行回顾性队列研究发现,生存组在诊断脓毒症后第 1 日的外周血淋巴细胞计数与死亡组无明显差异,但在第 4 日显著高于死亡组,生存组第 4 日的淋巴细胞恢复水平明显高于死亡组;且持续严重的淋巴细胞减少症与高继发感染率以及高 APACHE II 评分相关。特别是动物实验发现,使用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 抑制剂或采用转基因技术使抗凋亡蛋白 Bcl-2 高表达均能抑制脓毒症小鼠淋巴细胞凋亡出现,并可显著提高小鼠生存率^[12-14]。

淋巴细胞凋亡与预后不佳的机制至今尚未阐明。近年研究发现,内质网应激介导的细胞凋亡及相继造成的免疫抑制可能是机制之一。既往认为,脓毒症是未控制的 SIRS,但现研究表明抗炎和促炎反应机制共同作用于脓毒症^[1]。早期促炎反应之后部分患者进入代偿性抗炎反应阶段,此阶段以 T 细

胞及抗原呈递细胞抑制性受体增加、促炎细胞因子生成减少、骨髓抑制细胞增加及淋巴细胞和树突细胞凋亡为特征^[15-17]。脓毒症淋巴细胞凋亡途径主要包括死亡受体与线粒体信号途径,而近年发现内质网应激介导的细胞凋亡也是重要的途径,其中持续激活的 IRE1 以及 PERK-CHOP 信号通路是其重要的分子机制^[18-19]。通过凋亡清除淋巴细胞能减轻炎症反应,但是过度淋巴细胞凋亡可导致机体免疫功能下降,易发生继发性院内感染。既往尸体解剖证实,脓毒症死亡患者存在严重免疫细胞缺乏及持续性感染^[20],而这种免疫功能障碍是导致脓症患者预后不佳、病死率高的因素。正如本研究发现:死亡组内质网应激活化的标志物 CHOP mRNA、GRP78 mRNA 表达水平快速、显著且持续升高,升高的幅度和时间似乎较淋巴细胞凋亡率更趋明显。而且,CHOP mRNA 表达水平与外周血淋巴细胞凋亡率呈正相关,这些均提示脓症患者内质网应激活化快速出现,继而促进淋巴细胞凋亡增加,可能是造成预后不良的机制。

CHOP 是内质网应激相关性细胞凋亡中的重要转录调节因子,它能抑制细胞存活促进因子 Bcl-2 并促进内质网氧化还原酶 1 α (ERO1 α) 生成,使得线粒体膜通透性改变,最终导致细胞凋亡^[18]。Esposito 等^[21]用脂多糖 (LPS) 注射法制备急性肾损伤小鼠模型发现,CHOP 基因敲除鼠肾组织淋巴细胞凋亡水平是野生鼠的 1.7 倍,炎症反应水平增加且急性肾损伤程度加重。提示 CHOP 在急性肾损伤炎症反应中发挥了保护作用。但 Ferlito 等^[22]用 LPS 注射法制备脓毒症小鼠模型发现,CHOP 基因敲除鼠肺组织细胞凋亡水平较野生鼠降低、炎症反应降低、病原菌清除速度加快,8 d 生存率显著提高 (87.5% 比 12.5%),说明 CHOP 表达在脓毒症肺组织中淋巴细胞凋亡及炎症发生中发挥了促进作用,且其表达水平与生存率呈负相关。不同的结果可能与实验组织、细胞类型及病理状况不同有关。本研究发现,入 ICU 1 d 时,脓毒症死亡组 CHOP 水平快速且极为显著升高,但随后快速下降,7 d 时升高幅度远小于 1 d 时,提示在脓毒症发展中 CHOP 可能发挥减少淋巴细胞凋亡和减轻炎症反应的保护作用。

本研究还显示,脓毒症生存组和死亡组均存在 GRP78 水平增加。GRP78 是一种内质网特异性伴侣蛋白,正常情况下它与内质网应激跨膜感受器结合,使后者处于非活性状态;应激产生后 GRP78

转而与未折叠和(或)错误折叠蛋白多肽链结合,通过解离释放而激活内质网应激跨膜感受器^[6],并参与 UPR 的启动与调节,是检测内质网应激的重要生物学标志物。本研究发现,GRP78 mRNA 表达在脓毒症死亡患者中明显增高,表明内质网途径被激活,这与既往研究相符。马涛等^[23]用 CLP 制备脓毒症鼠模型,术后 24 h 检测小鼠脾组织 GRP78 mRNA 表达水平显著升高 (0.807 ± 0.122 比 0.314 ± 0.107)。Liu 等^[24]用蛙皮素联合 LPS 制备体外急性胰腺炎细胞模型,GRP78 敲除后死亡受体及线粒体凋亡途径中的重要信号分子 caspase-3、-8、-9 表达均上升,提示 GRP78 与脓毒症外周血淋巴细胞凋亡有关。此外,Gu 等^[25]用棕榈酸钠引发肝细胞内质网应激,并采取质粒转染法使得肝细胞内 GRP78 高表达,结果发现,GRP78 高表达能减弱内质网应激引起的 CHOP 表达升高,并减轻内质网应激相关性细胞凋亡,提示 GRP78 也可能通过降低 CHOP 表达水平减少淋巴细胞凋亡,从而发挥细胞保护作用。

本研究也存在不足之处。首先,脓毒症组和健康对照组间混杂因素较多,如营养状况、基础疾病以及是否存在并发症。再者,不同病因的脓症患者可能存在病理生理学差异。最后,影响脓毒症发病时间点判定的因素较为复杂,部分患者可能存在潜在的时间滞后等。

综上,本研究提示淋巴细胞凋亡增加和内质网应激途径被活化在脓毒症发生发展中发挥了作用,并与预后密切相关。细胞凋亡转录因子 CHOP 和淋巴细胞凋亡率显著相关,提示内质网应激途径可能是促使淋巴细胞凋亡的机制之一。

参考文献

- [1] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (9): 840-851.
- [2] Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007 [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40 (3): 754-761.
- [3] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13 (3): 260-268.
- [4] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response [J]. *Nature*, 2008, 454 (7203): 455-462.
- [5] Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5 (3): a013169.
- [6] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334 (6059): 1081-1086.
- [7] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4): 1250-1256.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data

- using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, et al. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators [J]. *Blood*, 1996, 87(10): 4261-4275.
- [10] Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome [J]. *Shock*, 2002, 18(6): 487-494.
- [11] Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, et al. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality [J]. *Shock*, 2014, 42(5): 383-391.
- [12] 张淑文, 孙成栋, 文燕, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血清内毒素及脾脏特异性免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(2): 91-94.
- [13] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(25): 14541-14546.
- [14] Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 496-501.
- [15] Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure [J]. *JAMA*, 2011, 306(23): 2594-2605.
- [16] Venet F, Chung CS, Monneret G, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 523-535.
- [17] 张红金, 刘娇, 吴相伟, 等. 大黄对烫伤后脓毒症大鼠糖皮质激素受体表达和外周血淋巴细胞的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(3): 186-189.
- [18] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190.
- [19] 姚咏明, 祝筱梅. 提高内质网应激在脓毒症中作用和意义的认识[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(9): 513-515.
- [20] Torgersen C, Moser P, Luckner G, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis [J]. *Anesth Analg*, 2009, 108(6): 1841-1847.
- [21] Esposito V, Grosjean F, Tan J, et al. CHOP deficiency results in elevated lipopolysaccharide-induced inflammation and kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(4): F440-450.
- [22] Ferlito M, Wang Q, Fulton WB, et al. Hydrogen sulfide [corrected] increases survival during sepsis: protective effect of CHOP inhibition [J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1806-1814.
- [23] 马涛, 韩璐, 胡文全. 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[J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(1): 48-50.
- [24] Liu Y, Yang L, Chen KL, et al. Knockdown of GRP78 promotes apoptosis in pancreatic acinar cells and attenuates the severity of cerulein and LPS induced pancreatic inflammation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92389.
- [25] Gu X, Li K, Laybutt DR, et al. Bip overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells [J]. *Life Sci*, 2010, 87(23-26): 724-732.

(收稿日期: 2014-11-03) (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

重症加强治疗病房感染性心内膜炎的危险因素、预后和长期随访

为确定感染性心内膜炎的短期、中期和长期预后影响因素,以及是否需要在重症加强治疗病房(ICU)治疗,有学者在两家医院ICU进行了一项医疗问卷长期随访的回顾性分析。研究纳入了2002年至2009年符合感染性心内膜炎改良Duke诊断标准并需在ICU住院治疗的216例患者,年龄(62±14)岁,31%为女性,15.7%为人工瓣膜心内膜炎,74%确定了感染源,57%进行了手术。56例(24.9%)患者在ICU内死亡;9例患者被送到临终病房,并在几日后死亡;随访期间死亡44例。多因素Cox回归分析确定了以下独立危险因素:初始30d内简化急性生理学评分II(SAPS II)升高与多器官功能衰竭明显相关;100d内SAPS II升高和白细胞计数最高值与患者远期病死率明显相关。在ICU进行外科干预是患者30d内预后较佳的独立预测指标。该研究证实,与一般感染性心内膜炎患者不同,感染源和感染受损瓣膜类型不可作为危重感染性心内膜炎患者生存预测的主要因素。急性感染生物标志物和疾病严重程度(评分和器官衰竭)是死亡的独立危险因素。手术清除受感染的瓣膜、装置或脓肿是30d预后的独立预测因素。

喻文, 罗红敏, 编译自《Infection》, 2015-01-10(电子版)

洗必泰与肥皂水洗浴对预防外科重症加强治疗病房院内获得性感染的随机对照试验研究

外科重症加强治疗病房(SICU)中对于最常见的手术部位、血行感染、导管相关性尿路感染和呼吸机相关性肺炎(VAP)4种院内获得性感染的预防是十分重要的。有学者进行了一项单中心随机对照双盲研究,比较用肥皂水为患者每日洗浴与用2%洗必泰每48h为患者洗浴至28d对预防4种院内获得性感染的效果。该研究纳入2012年7月至2013年5月期间收入SICU且预期停留≥48h的350例成年患者(排除Braden评分<9分、妊娠或皮肤对刺激过敏者)。采用分层的Cox回归多终点生存模型进行初步分析。结果显示:共入选325例患者(肥皂水组164例,洗必泰组161例),57%为男性,59%为白种人,年龄(60±16)岁,急性生理学及慢性健康状况评分系统II(APACHE II)评分(26±9)分,且有明显的合并症(38%合并肝肾功能衰竭,50%合并肾功能衰竭)。肥皂水组和洗必泰组共有53例患者发生院内获得性感染:2例血行感染(2比0),21例导管相关性尿路感染(14比7),9例手术部位感染(6比3),21例VAP(13比8)。相对于肥皂水洗浴,2%洗必泰洗浴可降低院内感染的风险[相对危险度(HR)=0.555,95%可信区间(95%CI)=0.309~0.998,P=0.049]。肥皂水组和洗必泰组每1000日院内感染发生率的风险分别为:血行感染2比0,导管相关性尿路感染22比12,VAP40比26,手术部位感染12比6。该研究证实,与每日肥皂水洗浴相比,每48h洗必泰洗浴可使SICU患者4种常见的院内获得性感染风险下降44%。

喻文, 罗红敏, 编译自《Crit Care Med》, 2014, 42(12): A1369-1370