

脓毒症诱导小鼠淋巴器官 JNK 和 CHOP 凋亡途径及刺激炎性细胞因子的变化

李青青¹ 陆刚¹ 丁恽虹¹ 刘建军¹ 黎健² 唐建国¹ 张学敏¹

¹复旦大学附属上海市第五人民医院创伤急救危重症中心,上海 200240; ²上海交通大学附属瑞金医院临床研究中心,上海 200025

通信作者:张学敏, Email: zhangxm922@126.com

【摘要】 目的 探讨脓毒症小鼠不同时间点免疫相关器官组织 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)凋亡状况及细胞因子水平变化。方法 采用区组随机法将 27 只雄性 BALB/c 小鼠分为正常组、脓毒症 6 h 组、脓毒症 12 h 组,每组 9 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型。各组分别于相应时间点取血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-10)等细胞因子水平;取血后处死小鼠取脾脏、胸腺、阑尾组织,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化 JNK(p-JNK)、JNK1、CHOP、活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达。结果 与正常组比较,脓毒症 6 h 组细胞因子水平和脾脏组织 p-JNK/JNK1 比值、CHOP、caspase-3 表达量以及胸腺、阑尾组织 CHOP、caspase-3 表达量均显著升高[血清 TNF- α (ng/L): 24.29 \pm 3.09 比 2.93 \pm 2.09,血清 IL-1 β (ng/L): 5.00 \pm 3.19 比 3.54 \pm 1.53,血清 IL-10(ng/L): 1 963.93 \pm 270.20 比 275.09 \pm 45.21,脾脏 p-JNK/JNK1 比值: 0.257 \pm 0.126 比 0.154 \pm 0.068,脾脏 CHOP/ β -actin: 0.201 \pm 0.131 比 0.142 \pm 0.068,脾脏 caspase-3/ β -actin: 0.215 \pm 0.126 比 0.098 \pm 0.088,胸腺 CHOP/ β -actin: 0.122 \pm 0.071 比 0.089 \pm 0.067,胸腺 caspase-3/ β -actin: 0.258 \pm 0.145 比 0.108 \pm 0.045,阑尾 CHOP/ β -actin: 0.361 \pm 0.134 比 0.215 \pm 0.112,阑尾 caspase-3/ β -actin: 0.439 \pm 0.211 比 0.321 \pm 0.145,均 $P < 0.05$],而胸腺、阑尾组织 p-JNK/JNK1 比值差异无统计学意义(胸腺 p-JNK/JNK1 比值: 1.221 \pm 0.776 比 1.168 \pm 0.475,阑尾 p-JNK/JNK1 比值: 2.014 \pm 1.227 比 1.828 \pm 0.915,均 $P > 0.05$)。脓毒症 12 h 组除 IL-10 水平明显下降外,其他细胞因子水平及脾脏、胸腺、阑尾组织 p-JNK/JNK1 比值、CHOP、caspase-3 表达量均较脓毒症 6 h 组进一步升高[血清 IL-10(ng/L): 1 698.98 \pm 210.52 比 1 963.93 \pm 270.20,血清 TNF- α (ng/L): 41.66 \pm 6.57 比 24.29 \pm 3.09,血清 IL-1 β (ng/L): 10.37 \pm 4.14 比 5.00 \pm 3.19,脾脏 p-JNK/JNK1 比值: 0.399 \pm 0.135 比 0.257 \pm 0.126,脾脏 CHOP/ β -actin: 0.298 \pm 0.145 比 0.201 \pm 0.131,脾脏 caspase-3/ β -actin: 0.353 \pm 0.145 比 0.215 \pm 0.126,胸腺 p-JNK/JNK1 比值: 1.667 \pm 0.891 比 1.221 \pm 0.776,胸腺 CHOP/ β -actin: 0.207 \pm 0.133 比 0.122 \pm 0.071,胸腺 caspase-3/ β -actin: 0.416 \pm 0.179 比 0.258 \pm 0.145,阑尾 p-JNK/JNK1 比值: 2.425 \pm 1.361 比 2.014 \pm 1.227,阑尾 CHOP/ β -actin: 0.456 \pm 0.189 比 0.361 \pm 0.134,阑尾 caspase-3/ β -actin: 0.635 \pm 0.289 比 0.439 \pm 0.211,均 $P < 0.05$]。结论 内质网途径 JNK 和 CHOP 通路参与小鼠脓毒症时免疫相关细胞凋亡及细胞因子表达,脓毒症 12 h 较 6 h 时凋亡更加明显,炎症反应更强。

【关键词】 脓毒症; 凋亡; c-Jun 氨基末端激酶; CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; 细胞因子

基金项目:上海市闵行区自然科学基金项目(2017MHZ14)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200422-00321

Sepsis induces JNK and CHOP pathways apoptosis of lymphoid organs and stimulates inflammatory cytokines changes in the mice

Li Qingqing¹, Lu Gang¹, Ding Yihong¹, Liu Jianjun¹, Li Jian², Tang Jianguo¹, Zhang Xuemin¹

¹Trauma Emergency Center, Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200240, China;

²Clinical Research Center, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Corresponding author: Zhang Xuemin, Email: zhangxm922@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the c-Jun N-terminal kinase (JNK), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) pathway apoptosis and the changes of cytokine levels in immune-related organs and tissues of sepsis mice at different time points. **Methods** Twenty-seven male BALB/c mice were divided into normal group, sepsis 6 hours group and sepsis 12 hours group by the block randomization method, with 9 mice in each group. The sepsis model was made by cecal ligation and puncture (CLP). Blood sample was collected from each group at the corresponding time point, and the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-1 β , IL-10) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The spleen, thymus and appendix tissues were taken from the mice to detect the expressions of phosphorylation-JNK (p-JNK), JNK1, CHOP and cleaved caspase-3 protein by Western Blot. **Results** The level of cytokines, p-JNK/JNK1 ratio, CHOP and caspase-3 in spleen tissues, and the CHOP, caspase-3 in thymus and appendix tissue in the sepsis 6 hours group were significantly higher than those in the normal group [serum TNF- α (ng/L): 24.29 \pm 3.09 vs. 2.93 \pm 2.09, serum IL-1 β (ng/L): 5.00 \pm 3.19 vs. 3.54 \pm 1.53,

serum IL-10 (ng/L): 1963.93 ± 270.20 vs. 275.09 ± 45.21 , spleen p-JNK/JNK1 ratio: 0.257 ± 0.126 vs. 0.154 ± 0.068 , spleen CHOP/ β -actin: 0.201 ± 0.131 vs. 0.142 ± 0.068 , spleen caspase-3/ β -actin: 0.215 ± 0.126 vs. 0.098 ± 0.088 , thymus CHOP/ β -actin: 0.122 ± 0.071 vs. 0.089 ± 0.067 , thymus caspase-3/ β -actin: 0.258 ± 0.145 vs. 0.108 ± 0.045 , appendix CHOP/ β -actin: 0.361 ± 0.134 vs. 0.215 ± 0.112 , appendix caspase-3/ β -actin: 0.439 ± 0.211 vs. 0.321 ± 0.145 , all $P < 0.05$]. However, there were no significant difference in the p-JNK/JNK1 ratio in thymus and appendix (thymus p-JNK/JNK1 ratio: 1.221 ± 0.776 vs. 1.168 ± 0.475 , appendix p-JNK/JNK1 ratio: 2.014 ± 1.227 vs. 1.828 ± 0.915 , both $P > 0.05$). Cytokine levels and the p-JNK/JNK1 ratio, CHOP, caspase-3 in spleen, thymus, and appendix in the sepsis 12 hours group were further increased when compared with those in the sepsis 6 hours group, except for a significant decrease in IL-10 level [serum IL-10 (ng/L): 1698.98 ± 210.52 vs. 1963.93 ± 270.20 , serum TNF- α (ng/L): 41.66 ± 6.57 vs. 24.29 ± 3.09 , serum IL-1 β (ng/L): 10.37 ± 4.14 vs. 5.00 ± 3.19 , spleen p-JNK/JNK1 ratio: 0.399 ± 0.135 vs. 0.257 ± 0.126 , spleen CHOP/ β -actin: 0.298 ± 0.145 vs. 0.201 ± 0.131 , spleen caspase-3/ β -actin: 0.353 ± 0.145 vs. 0.215 ± 0.126 , thymus p-JNK/JNK1 ratio: 1.667 ± 0.891 vs. 1.221 ± 0.776 , thymus CHOP/ β -actin: 0.207 ± 0.133 vs. 0.122 ± 0.071 , thymus caspase-3/ β -actin: 0.416 ± 0.179 vs. 0.258 ± 0.145 , appendix p-JNK/JNK1 ratio: 2.425 ± 1.361 vs. 2.014 ± 1.227 , appendix CHOP/ β -actin: 0.456 ± 0.189 vs. 0.361 ± 0.134 , appendix caspase-3/ β -actin: 0.635 ± 0.289 vs. 0.439 ± 0.211 , all $P < 0.05$]. **Conclusions** The endoplasmic reticulum pathway JNK and CHOP pathways are involved in immune-related cell apoptosis and cytokine expression in mice with sepsis. Apoptosis is more obvious at 12 hours than at 6 hours, and the inflammatory response is stronger.

【Key words】 Sepsis; Apoptosis; c-Jun N-terminal kinase; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; Cytokine

Fund program: Natural Science Research Foundation of Minhang District of Shanghai of China (2017MHZ14)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20200422-00321

脓毒症时机体存在大量淋巴细胞凋亡,淋巴细胞凋亡是脓毒症患者免疫抑制的主要原因,脓毒症诱导免疫抑制的主要特征包括T细胞功能障碍,其特征是脾脏T细胞凋亡,分化抗原4叉头翼状螺旋转录因子调节性T细胞(CD4⁺FoxP3⁺Tregs)升高,辅助性T细胞1(Th1)反应抑制^[1]。高水平的T淋巴细胞凋亡不仅导致大量免疫效应细胞丢失,而且激活多种信号通路,导致机体免疫系统受到明显抑制;而减少T淋巴细胞的凋亡可以改善机体的免疫功能,提高脓毒症存活率^[2]。

免疫调节治疗为脓毒症治疗提供了一个新的研究方向,它的成功依赖于对脓毒症发病机制的正确理解和免疫状态的准确评估。c-Jun氨基末端激酶(JNK)和CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)都是内质网凋亡通路的蛋白;天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)是各凋亡途径下游的执行分子,是细胞凋亡执行过程中的一个关键蛋白酶^[3],其上游的起始分子可以来自外在途径,也可以是来自线粒体途径或是内质网应激途径的相关蛋白。本研究中采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症小鼠模型,通过检测富含淋巴细胞的免疫相关器官,即脾脏、胸腺、阑尾组织细胞中磷酸化JNK(p-JNK)、JNK1、CHOP、活化的caspase-3蛋白表达,以及血中细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-10)水平的变化,来探讨内质网凋亡途径在脓毒症时免疫相关组织细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂:小鼠TNF- α 、IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(ANAGEN公司,加拿大);IL-10 ELISA试剂盒(RayBiotech公司,美国);p-JNK、CHOP、caspase-3兔单克隆抗体(Cell Signaling公司,美国);JNK1兔单克隆抗体(abcam公司,英国)。

1.2 实验动物及分组:27只SPF级雄性BALB/c小鼠,6~8周龄,体重18~23g,由上海中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(沪)2014-0008。所有小鼠饲养在温度和湿度受控的动物房中,12h/12h的光/暗循环,自由进食水。采用区组随机法将小鼠分为正常组、脓毒症6h组和脓毒症12h组,每组9只。

1.3 脓毒症模型制备:采用CLP制备脓毒症小鼠模型^[4]。小鼠禁食12h后用3%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉,在腹部正中切开长约1~2cm切口,开腹分离盲肠,用4-0丝线距盲肠根部1/2处结扎,随后用无菌9号注射针在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺2次,两个针孔相距3mm,第一针孔距离盲肠盲端3mm,挤压盲肠使粪便流出,将肠管还纳于腹腔,逐层缝合关腹,术后大鼠分笼饲养,不限制食水。正常组不予任何处理。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,经复旦大学附属上海市第五人民医院医学伦理委员会批准(审批号:2019-008)。

1.4 检测指标及方法:3组小鼠分别在正常状态

下、CLP 术后 6 h、CLP 术后 12 h 采血并处死,取脾脏、胸腺、阑尾组织。取血置于离心玻璃管中室温放置 30 min,低温分离血清(4 °C、10 min),取上清于 -70 °C 保存,用于测定炎症因子水平;打开胸腔、腹腔,分别取出胸腺及剪取部分脾脏、阑尾组织于冻存管 -70 °C 保存,用于检测蛋白表达。

1.4.1 血清炎症因子测定:从冰箱中取出血清后 4 °C 复融,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平。

1.4.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测蛋白表达:从冰箱中取出脾脏、胸腺、阑尾组织,解冻后用裂解液裂解,提取组织蛋白,应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行蛋白质分离,上样后在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,以电转膜方法将蛋白质转移至醋酸纤维素膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入相关一抗孵育,4 °C 振荡过夜,次日 5% 磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜,加入对应二抗孵育,振荡 1 h,5% PBST 洗膜,置于显影仪中曝光显影。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,用 Quantity One 凝胶分析软件分析 p-JNK、JNK1、CHOP、活化的 caspase-3 蛋白条带灰度值。

1.5 统计学分析:使用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。计量结果均呈正态分布,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎症因子水平(表 1):与正常组比较,脓毒症 6 h 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。与脓毒症 6 h 组比较,脓毒症 12 h 组 TNF- α 、IL-1 β 水平进一步升高(均 $P < 0.05$),而 IL-10 水平明显降低($P < 0.05$)。

组别	动物数(只)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-10 (ng/L)
正常组	9	2.93 \pm 2.09	3.54 \pm 1.53	275.09 \pm 45.21
脓毒症 6 h 组	9	24.29 \pm 3.09 ^a	5.00 \pm 3.19 ^a	1963.93 \pm 270.20 ^a
脓毒症 12 h 组	9	41.66 \pm 6.57 ^{ab}	10.37 \pm 4.14 ^{ab}	1698.98 \pm 210.52 ^{ab}

注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-1 β 为白细胞介素-1 β , IL-10 为白细胞介素-10;与正常组比较,^a $P < 0.05$;与脓毒症 6 h 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 脾脏组织蛋白表达(表 2; 图 1):脓毒症 6 h 组 p-JNK/JNK1 比值及 CHOP、caspase-3 蛋白表达量明显高于正常组,且脓毒症 12 h 组蛋白表达量均进一步高于脓毒症 6 h 组(均 $P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠脾脏组织 p-JNK/JNK1 比值和 CHOP、caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	p-JNK/JNK1 比值	CHOP/ β -actin	caspase-3/ β -actin
正常组	9	0.154 \pm 0.068	0.142 \pm 0.068	0.098 \pm 0.088
脓毒症 6 h 组	9	0.257 \pm 0.126 ^a	0.201 \pm 0.131 ^a	0.215 \pm 0.126 ^a
脓毒症 12 h 组	9	0.399 \pm 0.135 ^{ab}	0.298 \pm 0.145 ^{ab}	0.353 \pm 0.145 ^{ab}

注:p-JNK 为磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶,JNK1 为 c-Jun 氨基末端激酶 1,CHOP 为 CCAAT/ 增强子结合蛋白同源蛋白,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白;与正常组比较,^a $P < 0.05$;与脓毒症 6 h 组比较,^b $P < 0.05$

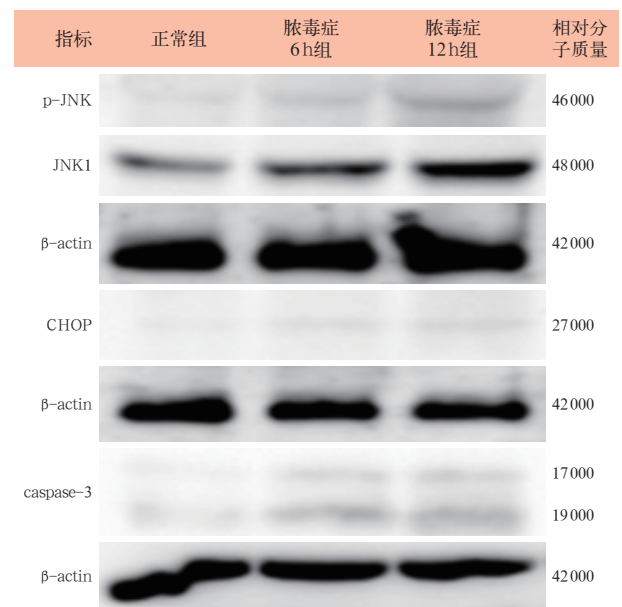


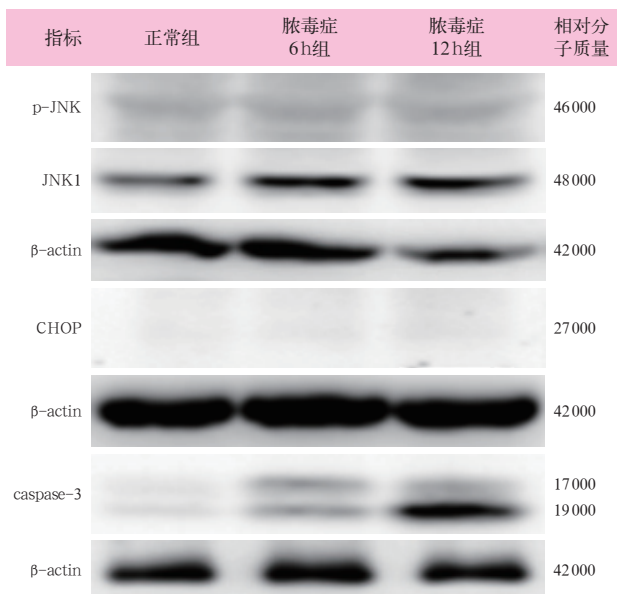
图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠脾脏组织 p-JNK、JNK1、CHOP 和 caspase-3 蛋白表达

2.3 胸腺组织蛋白表达(表 3; 图 2):与正常组比较,脓毒症 6 h 组 p-JNK/JNK1 比值差异无统计学意义($P > 0.05$),CHOP、caspase-3 蛋白表达量明显升高(均 $P < 0.05$)。脓毒症 12 h 组 p-JNK/JNK1 比值及 CHOP、caspase-3 表达量明显高于脓毒症 6 h 组(均 $P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠胸腺组织 p-JNK/JNK1 比值和 CHOP、caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

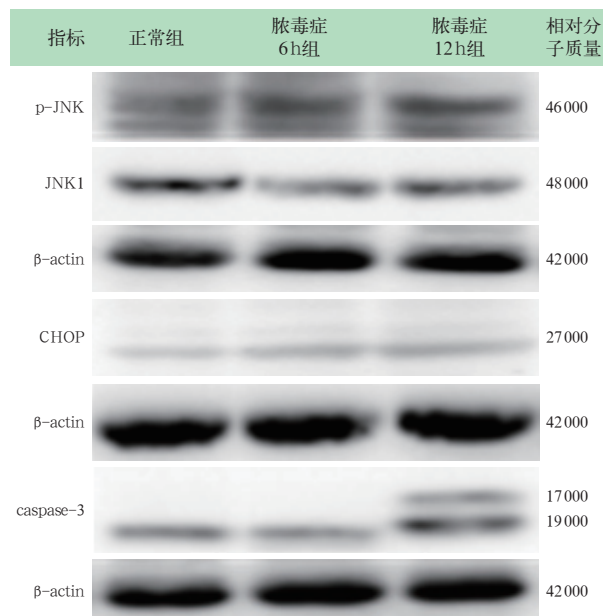
组别	动物数(只)	p-JNK/JNK1 比值	CHOP/ β -actin	caspase-3/ β -actin
正常组	9	1.168 \pm 0.475	0.089 \pm 0.067	0.108 \pm 0.045
脓毒症 6 h 组	9	1.221 \pm 0.776	0.122 \pm 0.071 ^a	0.258 \pm 0.145 ^a
脓毒症 12 h 组	9	1.667 \pm 0.891 ^{ab}	0.207 \pm 0.133 ^{ab}	0.416 \pm 0.179 ^{ab}

注:p-JNK 为磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶,JNK1 为 c-Jun 氨基末端激酶 1,CHOP 为 CCAAT/ 增强子结合蛋白同源蛋白,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白;与正常组比较,^a $P < 0.05$;与脓毒症 6 h 组比较,^b $P < 0.05$



p-JNK为磷酸化c-Jun氨基末端激酶, JNK1为c-Jun氨基末端激酶1, CHOP为CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白, caspase-3为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3, β-actin为β-肌动蛋白

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠胸腺组织 p-JNK、JNK1、CHOP和caspase-3蛋白表达



p-JNK为磷酸化c-Jun氨基末端激酶, JNK1为c-Jun氨基末端激酶1, CHOP为CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白, caspase-3为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3, β-actin为β-肌动蛋白

图3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠阑尾组织 p-JNK、JNK1、CHOP和caspase-3蛋白表达

2.4 阑尾组织蛋白表达(表4;图3):与正常组比较,脓毒症6h组p-JNK/JNK1比值差异无统计学意义($P>0.05$),CHOP、caspase-3表达量明显升高(均 $P<0.05$)。脓毒症12h组p-JNK/JNK1比值及CHOP、caspase-3蛋白表达量较脓毒症6h组进一步升高(均 $P<0.05$)。

表4 各组小鼠阑尾组织 p-JNK/JNK1 比值和 CHOP、caspase-3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	p-JNK/JNK1 比值	CHOP/ β -actin	caspase-3/ β -actin
正常组	9	1.828 \pm 0.915	0.215 \pm 0.112	0.321 \pm 0.145
脓毒症6h组	9	2.014 \pm 1.227	0.361 \pm 0.134 ^a	0.439 \pm 0.211 ^a
脓毒症12h组	9	2.425 \pm 1.361 ^{ab}	0.456 \pm 0.189 ^{ab}	0.635 \pm 0.289 ^{ab}

注:p-JNK为磷酸化c-Jun氨基末端激酶, JNK1为c-Jun氨基末端激酶1, CHOP为CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白, caspase-3为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3, β-actin为β-肌动蛋白;与正常组比较, ^a $P<0.05$;与脓毒症6h组比较, ^b $P<0.05$

3 讨论

脓毒症是一种危及生命的疾病,是宿主对感染的一种失控反应,可导致严重的器官功能障碍,尽管液体复苏、感染灶的及时清除、抗菌药物的早期使用及加强器官功能支持和护理等方面的综合治疗取得了进展,但脓毒症仍然是重症监护病房(ICU)患者的主要死亡原因。脓毒症早期为抗感染反应激活,而到后期表现为免疫抑制^[5],脓症患者晚期免疫抑制或免疫麻痹是治疗困难、各种并发症发生及死亡

的主要原因。因此,研究脓毒症相关的免疫应答机制及寻找针对脓毒症过程并发的免疫反应可能进行调控的药物具有重要意义^[6]。

淋巴器官根据发生和功能的不同可分为中枢淋巴器官和周围淋巴器官两类。中枢淋巴器官胸腺是T细胞分化、发育、成熟的场所。周围淋巴器官脾脏的骨髓由密集的淋巴细胞构成,是机体发生特异性免疫的主要场所,边缘区以B细胞为主,但有较多的巨噬细胞,是脾内捕获抗原、识别抗原和诱发免疫应答的重要部位;阑尾具有丰富的淋巴组织,它担负着机体细胞免疫和体液免疫两大功能。研究表明,在脾脏中脾细胞和淋巴细胞凋亡与炎症的严重程度及预后密切相关^[7];28d内死亡的脓症患者外周血淋巴细胞凋亡率明显高于存活的脓症患者,淋巴细胞计数明显低于存活者^[8]。

内质网应激信号是由抑制物阻抗性酯酶1(IRE1)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、激活转录因子6(ATF6)3个上游蛋白质触发的^[9]。IRE1、PERK、ATF6信号通路并不直接引起程序性细胞死亡,而是激活CHOP和JNK通路,从而促进细胞死亡。JNK作为应激活化蛋白激酶,在炎症反应、细胞应激、凋亡中扮演着重要角色^[10]。JNK由3个基因编码, JNK1和JNK2基因在全身广泛表达,而JNK3基因呈限制性表达。在未受刺激的细胞中,

JNK 主要存在于胞质内; 在外界刺激因素作用下, JNK 通过上游的酶促级联反应发生磷酸化, 磷酸化后形成其活化形式 p-JNK, 迅速移位到细胞核并发挥作用^[11]。本研究显示, 小鼠 CLP 术后 12 h 脾脏、胸腺、阑尾组织 p-JNK/JNK1 比值均高于正常组。Ma 等^[12]通过实验发现, CLP 术后淋巴细胞凋亡的同时会诱导与内质网应激相关的重要基因葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和内质网核信号转导蛋白 1 (XBP1) 的 mRNA 表达, CHOP 的蛋白和基因表达水平也显著升高。CHOP 基因缺失导致脂多糖诱导的 IL-1 β 分泌减少^[13], CHOP 在脓毒症的发病机制中扮演重要角色似乎是合理的^[14]。本研究显示, 小鼠 CLP 术后 6 h 脾脏、胸腺、阑尾组织 CHOP 表达量均高于正常组, 术后 12 h 各组织中 CHOP 表达量进一步升高。caspase 是一个成员较多的蛋白酶家族, 在正常情况下以酶原的形式存在, 当细胞发生凋亡时, caspase-3 活化发挥促进细胞凋亡的作用^[15]。本研究显示, 小鼠 CLP 术后 6 h 脾脏、胸腺、阑尾组织 caspase-3 表达量均高于正常组, 术后 12 h 各组织中 caspase-3 表达量进一步升高。

脓毒症期间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 等细胞因子水平均会升高^[16-18], 其中 TNF- α 、IL-1 β 的协同作用被喻为是细胞因子诱发病理生理级联反应的“扳机”; 而抗炎细胞因子 IL-10, 虽然有研究表明它的产生会拮抗 TNF- α 、IL-1 β 等致炎作用, 但是在脓毒症中反而会增加器官损伤和病死率, 实际上, IL-10 血浆持续高水平只发生在死亡患者中, 存活者则显著降低, 因此, 促炎/抗炎介质失调与脓毒症严重程度和病死率有关^[19]。本实验中 CLP 术后小鼠无死亡, CLP 术后 6 h TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平明显高于正常组, 术后 12 h TNF- α 和 IL-1 β 水平较术后 6 h 进一步升高, 而 IL-10 水平低于术后 6 h 时。

综上, 本研究显示, 脓毒症时 JNK 和 CHOP 通路参与免疫相关细胞凋亡, 但本实验仅从器官组织进行研究, 存在不足之处, 今后进一步纯化这些免疫器官中的淋巴细胞及其亚群进行相关研究, 为脓毒症免疫相关细胞凋亡机制研究提供一定借鉴, 为临床免疫调节治疗脓毒症进一步提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Li W, Tu J, Liu X, et al. Farnesyltransferase inhibitor FTI-277 inhibits PD-L1 expression on septic spleen lymphocytes and promotes spleen lymphocyte activation [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 190 (1): 8-18. DOI: 10.1111/cei.12995.

[2] Li S, Zhu FX, Zhao XJ, et al. The immunoprotective activity of

interleukin-33 in mouse model of cecal ligation and puncture-induced sepsis [J]. Immunol Lett, 2016, 169: 1-7. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.11.009.

[3] Zhou Y, Yuan HR, Cui L, et al. Effects of visfatin on the apoptosis of intestinal mucosal cells in immunological stressed rats [J]. Acta Histochem, 2017, 119 (1): 26-31. DOI: 10.1016/j.aichis.2016.11.002.

[4] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31-36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.

[5] 蒋政宇, 卞金俊, 邓小明. 免疫反应代谢调控: 脓毒症研究的新方向 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (1): 122-125. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.01.025.

Jiang ZY, Bian JJ, Deng XM. Metabolic regulation of immune responses: new perspective for sepsis research [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (1): 122-125. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.01.025.

[6] Kong B, Wang X, Yang W, et al. Effects of simvastatin on the function of splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells in sepsis mice [J]. Immunol Res, 2018, 66 (3): 355-366. DOI: 10.1007/s12026-018-8994-7.

[7] Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis [J]. Pancreas, 2002, 24 (4): 365-372. DOI: 10.1097/00006676-200205000-00007.

[8] Jiang W, Zhong W, Deng Y, et al. Evaluation of a combination "lymphocyte apoptosis model" to predict survival of sepsis patients in an intensive care unit [J]. BMC Anesthesiol, 2018, 18 (1): 89. DOI: 10.1186/s12871-018-0535-3.

[9] Cabrera E, Hernández-Pérez S, Koundrioukoff S, et al. PERK inhibits DNA replication during the unfolded protein response via Claspin and Chk1 [J]. Oncogene, 2017, 36 (5): 678-686. DOI: 10.1038/onc.2016.239.

[10] Li ST, Dai Q, Zhang SX, et al. Ulinastatin attenuates LPS-induced inflammation in mouse macrophage RAW264.7 cells by inhibiting the JNK/NF- κ B signaling pathway and activating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39 (8): 1294-1304. DOI: 10.1038/aps.2017.143.

[11] Sabapathy K. Role of the JNK pathway in human diseases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 106: 145-169. DOI: 10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4.

[12] Ma T, Han L, Gao Y, et al. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis [J]. Eur Surg Res, 2008, 41 (2): 219-225. DOI: 10.1159/000135631.

[13] Endo M, Oyadomari S, Suga M, et al. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice [J]. J Biochem, 2005, 138 (4): 501-507. DOI: 10.1093/jb/mvi143.

[14] 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. DOI: 10.4049/jimmunol.1300835.

[15] Jiang H, Zhao PJ, Su D, et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2014, 9 (6): 2265-2272. DOI: 10.3892/mmr.2014.2108.

[16] 高经华, 刘喆滢, 刘志锋. 共抑制分子在脓毒症免疫功能障碍中作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (1): 121-125. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20190916-00023.

Gao JH, Liu ZY, Liu ZF. Study progress of role of co-suppressor molecules in sepsis immune dysfunction [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (1): 121-125. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20190916-00023.

[17] Ge W, Hu Q, Fang X, et al. LDK378 improves micro- and macro-circulation via alleviating STING-mediated inflammatory injury in a sepsis rat model induced by cecal ligation and puncture [J]. J Inflamm (Lond), 2019, 16: 3. DOI: 10.1186/s12950-019-0208-0.

[18] Çakır M, Tekin S, Okan A, et al. The ameliorating effect of cannabinoid type 2 receptor activation on brain, lung, liver and heart damage in cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 105978. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105978.

[19] Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis [J]. Infect Immun, 1996, 64 (11): 4733-4738. DOI: 10.1128/IAI.64.11.4733-4738.1996.