

• 论著 •

CREG 调控肺泡巨噬细胞自噬和极化参与脓毒症急性呼吸窘迫综合征及其临床价值研究

曹亮 邹芳 张长洪 徐凯伦 李景琦 赵建清 刘建华

河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科, 张家口 075000

通信作者: 刘建华, Email: 15530396730@163.com

【摘要】 目的 探讨细胞 E1A 激活基因阻遏子基因(CREG)在脓毒症急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中对肺泡巨噬细胞自噬与极化的调控作用及其临床价值。**方法** ① 细胞实验: 体外培养小鼠单核/巨噬细胞株 RAW264.7, 取对数生长期细胞, 诱导分化为肺泡巨噬细胞后分为 4 组: 空白对照组仅用完全培养基培养; 脂多糖(LPS)组加入 5 mg/L LPS 刺激 24 h, 构建脓毒症 ARDS 模型; CREG 过表达组用 2 mg CREG 过表达质粒 pLNCX2-CREG 转染细胞 6 h 后, 再给予 5 mg/L LPS 刺激 24 h; CREG 干扰组用 2 μ g CREG 干扰质粒 pSM2-siCREG 转染细胞 6 h 后, 再给予 5 mg/L LPS 刺激 24 h。采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测自噬标志物[自噬启动关键蛋白 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、自噬底物蛋白 p62]表达; 采用流式细胞仪检测巨噬细胞极化标志物[M1 型特征性标志物白细胞分化抗原 86(CD86)、M2 型特征性标志物 CD206]表达。② 临床试验: 采用前瞻性病例对照研究方法, 选择 2024 年 1 月至 12 月河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症监护病房收治的脓毒症患者, 根据入组后 72 h 内是否并发 ARDS 分为脓毒症 ARDS 组及脓毒症非 ARDS 组; 选择同期在本院体检的健康志愿者作为对照。收集各组研究对象性别、年龄、急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II)、氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)及实验室指标, 以及脓毒症患者的感染部位。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 CREG 及炎症标志物[白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)]水平。比较各组指标的差异; 采用多因素 Logistic 回归分析筛选脓毒症并发 ARDS 的独立影响因素; 绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线), 评估 CREG 对脓毒症并发 ARDS 的预测价值。**结果** ① 细胞实验结果: 与空白对照组比较, LPS 各组细胞 Beclin1、LC3-II/LC3-I 比值、CD206 表达降低[Beclin1 蛋白(Beclin1/ β -actin): 0.32 ± 0.05 比 0.87 ± 0.09 , LC3-II/LC3-I 比值: 0.41 ± 0.06 比 1.24 ± 0.11 , CD206: (27.14 ± 3.52)% 比 (51.78 ± 5.91)%, 均 $P < 0.05$], p62、CD86 表达升高[p62 蛋白(p62/ β -actin): 1.58 ± 0.13 比 0.53 ± 0.07 , CD86: (38.35 ± 4.67)% 比 (18.26 ± 3.24)%, 均 $P < 0.05$]; CREG 过表达可使上述自噬及极化指标显著改善, 而 CREG 干扰则可使上述指标进一步恶化(均 $P < 0.05$)。② 临床试验结果: 最终脓毒症 ARDS 组纳入 40 例, 脓毒症非 ARDS 组纳入 60 例, 健康对照组纳入 20 例。各组性别、年龄, 以及脓毒症 ARDS 组与脓毒症非 ARDS 组患者感染部位分布差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与健康对照组比较, 脓毒症组患者全身炎症负荷加重; 与脓毒症非 ARDS 组比较, 脓毒症 ARDS 组患者病情更严重, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 、血清 CREG 水平更低, 炎症标志物水平更高(均 $P < 0.05$), 且随 APACHE II 评分升高, 血清 CREG 水平逐渐降低, 炎症标志物水平逐渐升高。多因素 Logistic 回归分析显示, APACHE II 评分和炎症指标升高是脓毒症患者并发 ARDS 的独立危险因素[优势比(OR)均 > 1 , 均 $P < 0.05$], 而 CREG 升高是保护因素[OR = 0.385, 95% 置信区间(95%CI)为 0.344 ~ 0.432, $P = 0.015$]; ROC 曲线分析显示, CREG 预测脓毒症并发 ARDS 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.806(95%CI 为 0.713 ~ 0.899); 最佳截断值为 7.85 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感度为 71.43%, 特异度为 78.57%。**结论** CREG 可通过正向调控肺泡巨噬细胞自噬活性、纠正 M1/M2 极化失衡, 在脓毒症 ARDS 中发挥保护作用; 血清 CREG 升高是脓毒症并发 ARDS 的保护因素, 对脓毒症 ARDS 具有早期预测价值。

【关键词】 细胞 E1A 激活基因阻遏子基因; 脓毒症; 急性呼吸窘迫综合征; 肺泡巨噬细胞; 自噬; 巨噬细胞极化

基金项目: 2023 年度河北省医学科学研究课题计划(20230198)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251021-00518

Study on cellular repressor of E1A-stimulated genes regulating autophagy and polarization of alveolar macrophages in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome and its clinical value

Cao Liang, Zou Fang, Zhang Changhong, Xu Kailun, Li Jingqi, Zhao Jianqing, Liu Jianhua

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: Liu Jianhua, Email: 15530396730@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effects of cellular repressor of E1A-stimulated gene (CREG) on autophagy and polarization of alveolar macrophages in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) and its clinical value. **Methods** 1) Cell experiment: Mouse monocyte/macrophage cell line RAW264.7 was cultured *in vitro*. Cells in logarithmic growth phase were induced to differentiate into alveolar macrophages. The alveolar macrophages were

divided into four groups: the blank control group was cultured with complete medium only; the lipopolysaccharide (LPS) group was stimulated with 5 mg/L LPS for 24 hours to establish the sepsis-induced ARDS model; the CREG overexpression group was transfected with 2 mg CREG overexpression plasmid pLNCX2-CREG for 6 hours, followed by 5 mg/L LPS stimulation for 24 hours; the CREG interference group was transfected with 2 μ g CREG interference plasmid pSM2-siCREG for 6 hours, followed by 5 mg/L LPS stimulation for 24 hours. Western blotting was used to detect the expression of autophagy markers [autophagy initiation key protein Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), and autophagic substrate protein p62]. Flow cytometry was used to detect the expression of macrophage polarization markers [M1-type characteristic marker cluster of differentiation 86 (CD86) and M2-type characteristic marker CD206].

2) Clinical trial: A prospective case-control study was conducted in patients with sepsis admitted to the respiratory intensive care unit of The First Affiliated Hospital of Hebei North University from January to December 2024. Patients were divided into sepsis with ARDS group and sepsis without ARDS group based on whether they developed ARDS within 72 hours after enrollment. In addition, healthy volunteers who underwent health check-ups at the hospital during the same period were selected as the controls. Demographic data including gender, age, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score, oxygenation index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), and laboratory parameters were collected for each group, as well as the sites of infection for the septic patients. Serum levels of CREG and inflammatory markers [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), procalcitonin (PCT), and C-reactive protein (CRP)] were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The differences in the above indicators were compared among groups. Multivariate Logistic regression analysis was used to identify independent influencing factors for sepsis complicated with ARDS. Receiver operator characteristic curve (ROC curve) was plotted to evaluate the predictive value of CREG for sepsis complicated with ARDS.

Results 1) Cell experiment results: Compared with the blank control group, the expressions of Beclin1, LC3-II/LC3-I ratio, and CD206 were decreased in each LPS group [Beclin1 protein (Beclin1/ β -actin): 0.32 ± 0.05 vs. 0.87 ± 0.09 , LC3-II/LC3-I ratio: 0.41 ± 0.06 vs. 1.24 ± 0.11 , CD206: $(27.14 \pm 3.52)\%$ vs. $(51.78 \pm 5.91)\%$, all $P < 0.05$], while p62 and CD86 expressions were increased [p62 protein (p62/ β -actin): 1.58 ± 0.13 vs. 0.53 ± 0.07 , CD86: $(38.35 \pm 4.67)\%$ vs. $(18.26 \pm 3.24)\%$, both $P < 0.05$]. CREG overexpression significantly improved the above autophagy and polarization indicators, whereas CREG interference further exacerbated these indicators (all $P < 0.05$).

2) Clinical trial results: Ultimately, 40 patients were included in the sepsis with ARDS group, 60 in the sepsis without ARDS group, and 20 in the healthy control group. There were no statistically significant differences in gender, age among the three groups, nor in the distribution of infection sites between the sepsis with ARDS and sepsis without ARDS groups (all $P > 0.05$). Compared with the healthy control group, the patients with sepsis showed aggravated systemic inflammatory burden. Compared with the sepsis without ARDS group, the sepsis with ARDS group exhibited more severe disease, with lower $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ and CREG levels, and higher levels of inflammatory markers (all $P < 0.05$). As APACHE II score increased, serum CREG levels decreased progressively while inflammatory marker levels increased progressively. Multivariate Logistic regression analysis showed that elevated APACHE II score and inflammatory markers were independent risk factors for sepsis complicated with ARDS [all odds ratio (OR) > 1 , all $P < 0.05$], while elevated CREG was a protective factor [OR = 0.385, 95% confidence interval (95%CI) was 0.344–0.432, $P = 0.015$]. ROC curve analysis showed that the area under the ROC curve (AUC) of CREG for predicting sepsis complicated with ARDS was 0.806 (95%CI was 0.713–0.899); at the optimal cut-off value of 7.85 $\mu\text{g/L}$, the sensitivity was 71.43% and the specificity was 78.57%.

Conclusions CREG exerts a protective role in sepsis-induced ARDS by positively regulating alveolar macrophage autophagy activity and correcting M1/M2 polarization imbalance. Elevated serum CREG is a protective factor for sepsis complicated with ARDS and has early predictive value for sepsis-induced ARDS.

【Key words】 Cellular repressor of E1A-stimulated gene; Sepsis; Acute respiratory distress syndrome; Alveolar macrophage; Autophagy; Macrophage polarization

Fund program: 2023 Hebei Provincial Medical Science Research Project Plan (20230198)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251021-00518

脓毒症的病理核心是宿主对感染的免疫反应失调导致难以控制的炎症风暴和多器官功能障碍综合征^[1]。急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是脓毒症最常见且致命的并发症,目前缺乏特异有效的治疗手段^[2]。肺泡巨噬细胞为肺部天然免疫的核心效应细胞,在维持肺组织稳态及应对感染性损伤中发挥着关键作用^[3]。有研究表明,脓毒症状态下肺泡巨噬细胞功能紊乱, M1/M2 极化失衡及自噬活性异常是诱发肺部炎症风暴、加重肺组织损伤的重要病理基础,因此靶向调控肺泡巨噬细胞自噬与极化平衡,有望成为干预脓

毒症 ARDS 的新突破口^[4]。细胞 E1A 激活基因阻遏子基因 (cellular repressor of E1A-stimulated gene, CREG) 作为一种新型多功能分泌型糖蛋白,近年在炎症调控与免疫细胞功能领域的研究逐渐深入^[5]。研究证实,CREG 可通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, PI3K/Akt)、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等关键信号通路,参与炎症反应抑制、组织损伤修复及免疫细胞分化过程^[6]。基于此,本研究拟从细胞实验及临床样本两个层面,系统探讨 CREG 在脓毒症 ARDS 中的表达变化规律,阐明其调控肺泡巨噬细胞自噬

及极化的分子机制,明确 CREG 在脓毒症 ARDS 中的临床价值,以期为脓毒症 ARDS 的发病机制研究提供全新视角,同时为临床寻找脓毒症诊断标志物与靶向治疗靶点提供理论依据和实验基础。

1 资料与方法

1.1 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,已获得医院伦理委员会批准(审批号:K2022065)。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞来源及培养方法:小鼠单核/巨噬细胞株 RAW264.7 由北京协和细胞中心提供,实验于河北省肺部微生态致病机制研究与诊疗技术重点实验室完成。将 RAW264.7 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的高糖 DMEM 完全培养基中,在 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱内常规培养,待细胞生长密度达 70%~80% 时进行传代;取对数生长期细胞,以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,更换含终浓度为 20 μg/L 的重组小鼠巨噬细胞集落刺激因子(recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor, rmM-CSF)完全培养基,诱导分化为肺泡巨噬细胞;每日更换新鲜诱导培养基,持续培养 72 h,待细胞呈梭形或多角形且贴壁能力增强,说明诱导成功。采用流式细胞仪检测肺泡巨噬细胞标志物白细胞分化抗原 206(cluster 206 of differentiation, CD206)表达,阳性率 $\geq 80\%$ 判定为诱导合格。

1.2.2 细胞分组与干预:将诱导合格的肺泡巨噬细胞分为 4 组。① 空白对照组:仅用完全培养基培养,不进行任何处理;② 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组:直接加入终浓度为 5 mg/L 的 LPS 刺激 24 h,构建脓毒症 ARDS 模型;③ CREG 过表达组(过表达质粒 pLNCX2-CREG+LPS 组):采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 pLNCX2-CREG 导入细胞,每孔 2 mg,转染 6 h 后更换为完全培养基继续培养 12 h,再给予 5 mg/L LPS 刺激 24 h;④ CREG 干扰组(干扰质粒 pSM2-siCREG+LPS 组):采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 pSM2-siCREG 导入细胞,每孔 2 μg,转染 6 h 后更换为完全培养基继续培养 12 h,再给予 5 mg/L LPS 刺激 24 h。

1.2.3 检测指标及方法

1.2.3.1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺泡巨噬细胞自噬标志物表达:收集各组肺泡巨噬细胞,用含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白,定量后经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene

difluoride, PVDF)膜,以 5% 脱脂奶粉封闭;加入自噬启动关键蛋白 Beclin1(1:1 000)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3; 1:1 000)、自噬底物蛋白 p62(1:1 000)、内参 β -肌动蛋白(β -actin, 1:5 000)一抗,4 °C 孵育过夜;加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温孵育 1.5 h 后,增强化学发光显影。应用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值,以目的蛋白与对应内参的灰度值比值作为该蛋白的表达量。

1.2.3.2 肺泡巨噬细胞极化标志物检测:收集各组肺泡巨噬细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤 2 次,1 500 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min,调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,取 100 μL 细胞悬液加入流式管。设置同型对照管以排除非特异性结合;实验组分别加入异硫氰酸荧光素标记的 M1 型特征性标志物 CD86 抗体(每管 1 μL)和别藻蓝蛋白标记的 M2 型特征性标志物 CD206 抗体(每管 0.5 μL),轻轻混匀后 4 °C 避光孵育 30 min;用预冷的 PBS 洗涤 2 次去除未结合抗体后,重悬于 300 μL PBS 中,立即通过流式细胞仪检测,并应用 FlowJo 软件分别统计 CD86⁺ 细胞(M1 型)、CD206⁺ 细胞(M2 型)占总巨噬细胞的百分比。

1.3 临床试验

1.3.1 研究对象:采用前瞻性病例对照研究方法,选择 2024 年 1 月至 12 月河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症监护病房收治的诊断为脓毒症的患者。所有脓毒症患者症状出现后 24 h 内入组,统一收集基线临床资料,并取外周静脉血标本用于血清检测。根据入组后 72 h 内是否并发 ARDS,将患者分为脓毒症 ARDS 组及脓毒症非 ARDS 组;选择同期在本院体检中心体检的健康志愿者作为对照。

1.3.1.1 纳入标准:① 年龄 > 18 周岁;② 脓毒症符合 2016 年 Sepsis-3 诊断标准^[7];③ ARDS 符合 2012 年柏林定义^[8];④ ARDS 属于肺内源性损伤;⑤ 可合并并完成整个治疗过程,临床资料详细完整。

1.3.1.2 排除标准:① 合并慢性感染性疾病;② 伴有恶性肿瘤;③ 伴有人类免疫缺陷病毒感染或近期使用过免疫抑制剂;④ 存在其他疾病导致的肺部感染;⑤ 脓毒症发病前存在慢性呼吸系统疾病;⑥ 终末期肝、肾功能衰竭及妊娠期;⑦ 存在认知功能障碍或沟通障碍。

1.3.2 观察指标及方法

1.3.2.1 临床资料收集:收集研究对象的基线资料

与临床指标,包括性别、年龄、急性生理学与慢性健康状况评分 II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, APACHE II)、氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)、白蛋白 (albumin, Alb)、白细胞计数 (white blood cell count, WBC)、中性粒细胞计数 (neutrophil count, NEU)、血肌酐 (serum creatinine, SCr)、血乳酸 (lactic acid, Lac); 取研究对象的外周静脉血,采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA) 检测血清 CREG 及炎症标志物白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、降钙素原 (procalcitonin, PCT) 和 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 水平; 同时记录脓毒症患者感染部位。

1.3.2.2 不同病情严重程度脓毒症 ARDS 患者血清 CREG 及炎症标志物检测: 根据 APACHE II 评分将脓毒症 ARDS 患者分为低危组 (APACHE II 评分 < 10 分)、中危组 (APACHE II 评分 10 ~ 20 分)、高危组 (APACHE II 评分 > 20 分)^[9]。取患者外周静脉血,采用 ELISA 法检测血清 CREG 及炎症标志物 IL-6、TNF- α 、PCT 和 CRP 水平。

1.4 统计学分析: 所有数据应用 SPSS 26.0 统计软件处理。计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 正态检验符合正态分布,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,方差齐时两两比较采用 LSD- t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验; 计数资料以例数 (百分比) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用多因素 Logistic 回归分析筛选脓毒症并发 ARDS 的独立影响因素,通过共线性诊断评估回归模型的稳定性。绘制受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC 曲线),评估 CREG 对脓毒症并发 ARDS 的预测价值,并计算 ROC 曲线下面积 (area under the ROC curve, AUC)。所有检验均采用双侧检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

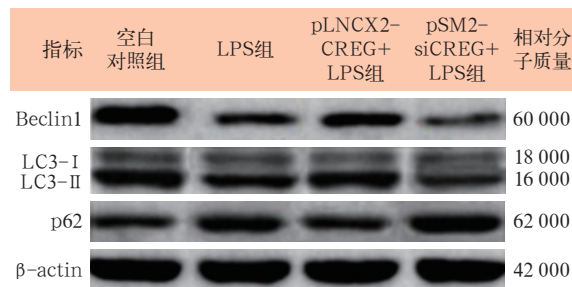
2 结果

2.1 细胞实验结果

2.1.1 巨噬细胞自噬标志物表达比较 (图 1; 表 1): 与空白对照组比较, LPS 各组细胞中 Beclin1 表达及 LC3-II/LC3-I 比值均降低, p62 表达均升高 (均 $P < 0.05$); CREG 过表达逆转了 LPS 诱导的自噬抑制, 而干扰 CREG 表达则加剧了自噬功能障碍。

2.1.2 各组肺泡巨噬细胞极化标志物表达水平比较 (表 2): 与空白对照组比较, LPS 各组细胞中 CD86 表达升高, CD206 表达降低 (均 $P < 0.05$); 过表达 CREG

能够逆转 LPS 诱导的细胞极化失衡, 而干扰 CREG 表达则呈现相反效应。



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, LPS 为脂多糖, pLNCX2-CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因 (CREG) 过表达质粒, pSM2-siCREG 为 CREG 干扰质粒, Beclin1 为自噬启动关键蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, p62 为自噬底物蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 1 Western blotting 检测各组肺泡巨噬细胞中自噬标志物蛋白表达

表 1 各组肺泡巨噬细胞中自噬标志物蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Beclin1 蛋白 (Beclin1/ β -actin)	LC3-II/ LC3-I 比值	p62 蛋白 (p62/ β -actin)
空白对照组	6	0.87 $\pm$ 0.09	1.24 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.07
LPS 组	6	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	0.41 $\pm$ 0.06 ^a	1.58 $\pm$ 0.13 ^a
pLNCX2-CREG+ LPS 组	6	0.71 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.02 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.79 $\pm$ 0.08 ^{ab}
pSM2-siCREG+ LPS 组	6	0.18 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.23 $\pm$ 0.04 ^{ab}	2.14 $\pm$ 0.16 ^{ab}
F 值		135.100	219.400	242.500
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: LPS 为脂多糖, pLNCX2-CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因 (CREG) 过表达质粒, pSM2-siCREG 为 CREG 干扰质粒, Beclin1 为自噬启动关键蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, p62 为自噬底物蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白; ^a 与空白对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

表 2 各组肺泡巨噬细胞中细胞极化标志物表达水平比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CD86	CD206
空白对照组	6	18.26 $\pm$ 3.24	51.78 $\pm$ 5.91
LPS 组	6	38.35 $\pm$ 4.67 ^a	27.14 $\pm$ 3.52 ^a
pLNCX2-CREG+LPS 组	6	25.19 $\pm$ 3.05 ^{ab}	39.87 $\pm$ 4.26 ^{ab}
pSM2-siCREG+LPS 组	6	49.62 $\pm$ 5.33 ^{ab}	21.45 $\pm$ 3.91 ^{ab}
F 值		66.610	54.550
P 值		<0.001	<0.001

注: LPS 为脂多糖, pLNCX2-CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因 (CREG) 过表达质粒, pSM2-siCREG 为 CREG 干扰质粒, CD 为白细胞分化抗原; ^a 与空白对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

2.2 临床试验结果

2.2.1 各组研究对象临床资料比较 (表 3): 各组研究对象性别、年龄, 以及脓毒症 ARDS 组与脓毒症非 ARDS 组患者感染部位分布差异均无统计学

表 3 各组研究对象临床资料比较

组别	例数 (例)	性别〔例(%)〕		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	APACHE II 评分分级〔例(%)〕			PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	Alb (g/L, $\bar{x} \pm s$)
		男性	女性		低危	中危	高危		
健康对照组	20	12(60)	8(40)	51.56 ± 5.27					43.25 ± 3.42
脓毒症非 ARDS 组	60	34(57)	26(43)	52.81 ± 5.76	37(62)	20(33)	3(5)	296.42 ± 32.17	38.47 ± 4.18 ^b
脓毒症 ARDS 组	40	26(65)	14(35)	54.10 ± 5.48	15(38)	18(45)	7(17)	227.90 ± 28.46 ^a	37.62 ± 4.90 ^b
统计量值		$\chi^2=0.694$		$F=1.471$	$\chi^2=7.305$			$t=10.920$	$F=12.140$
P 值		0.707		0.234	0.026			<0.001	<0.001

组别	例数 (例)	感染部位〔例(%)〕					WBC (×10 ⁹ /L, $\bar{x} \pm s$)	NEU (×10 ⁹ /L, $\bar{x} \pm s$)	SCr (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)
		肺部	腹部	泌尿系统	皮肤软组织	其他			
健康对照组	20						6.12 ± 1.25	4.55 ± 0.72	68.34 ± 8.12
脓毒症非 ARDS 组	60	23(38)	17(28)	12(20)	5(8)	3(5)	12.48 ± 3.21 ^b	12.34 ± 3.67 ^b	74.56 ± 9.75 ^b
脓毒症 ARDS 组	40	17(42)	9(22)	8(20)	4(10)	2(5)	13.79 ± 4.36 ^b	12.59 ± 3.85 ^b	75.94 ± 8.90 ^b
统计量值		$\chi^2=0.492$					$F=35.250$	$F=43.960$	$F=4.762$
P 值		0.974					<0.001	<0.001	<0.001

组别	例数 (例)	Lac (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	CREG (μg/L, $\bar{x} \pm s$)	IL-6 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)	TNF-α (ng/L, $\bar{x} \pm s$)	PCT (μg/L, $\bar{x} \pm s$)	CRP (mg/L, $\bar{x} \pm s$)
健康对照组	20	1.14 ± 0.21	18.76 ± 2.35	6.21 ± 0.94	4.98 ± 1.42	0.21 ± 0.04	10.23 ± 1.92
脓毒症非 ARDS 组	60	1.65 ± 0.54 ^b	10.24 ± 1.89 ^b	11.26 ± 1.85 ^b	15.75 ± 2.39 ^b	0.78 ± 0.20 ^b	20.45 ± 3.71 ^b
脓毒症 ARDS 组	40	1.82 ± 0.57 ^b	5.32 ± 1.94 ^{ab}	16.42 ± 4.31 ^{ab}	19.24 ± 4.81 ^{ab}	1.43 ± 0.59 ^{ab}	28.36 ± 6.82 ^{ab}
统计量值		$F=11.930$	$F=305.400$	$F=91.950$	$F=129.300$	$F=79.220$	$F=97.360$
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, APACHE II 为急性生理学与慢性健康状况评分 II, PaO₂/FiO₂ 为氧合指数, Alb 为白蛋白, WBC 为白细胞计数, NEU 为中性粒细胞计数, SCr 为血肌酐, Lac 为血乳酸, CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , PCT 为降钙素原, CRP 为 C-反应蛋白; 低危患者 APACHE II 评分 < 10 分, 中危患者 APACHE II 评分 10 ~ 20 分, 高危患者 APACHE II 评分 > 20 分; 1 mmHg=0.133 kPa; ^a 与脓毒症非 ARDS 组比较, $P<0.05$; ^b 与健康对照组比较, $P<0.05$; 空白代表无此项

意义(均 $P>0.05$); 与健康对照组比较, 脓毒症组患者 Alb、CREG 更低, WBC、NEU、SCr、Lac、IL-6、TNF- α 、PCT、CRP 更高(均 $P<0.05$); 与脓毒症非 ARDS 组比较, 脓毒症 ARDS 组患者病情更严重, PaO₂/FiO₂、CREG 更低, IL-6、TNF- α 、PCT、CRP 更高(均 $P<0.05$)。

2.2.2 不同病情严重程度脓毒症 ARDS 患者血清 CREG 及炎症标志物水平比较(表 4): 与低危组比较, 中危组患者 CREG 更低, IL-6、PCT、CRP 更高(均 $P<0.05$); 而高危组患者 CREG 水平较中危组进一步降低, IL-6、TNF- α 、PCT、CRP 水平较中危组进一步升高(均 $P<0.05$)。

2.2.3 脓毒症并发 ARDS 影响因素的多因素 Logistic 回归分析: 采用 Enter 法将脓毒症非 ARDS 组与脓毒症 ARDS 组差异有统计学意义的变量纳入二元多因素 Logistic 回归模型。建模前对所有连续型自变量进行的共线性诊断结果显示, 各变量方差膨胀因子(variance inflation factor, VIF)值介于 1.2 与 3.8 之间, 容忍度均大于 0.25, 表明不存在严重多重共线性, 提示模型具有稳定性。

多因素 Logistic 回归分析显示(表 5), APACHE II 评分、IL-6、TNF- α 、PCT 和 CRP 升高是脓毒症患者并发 ARDS 的独立危险因素, 而 CREG 升高是保

表 4 不同病情严重程度脓毒症 ARDS 患者血清 CREG 及炎症标志物水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	CREG (μg/L)	IL-6 (ng/L)
低危组	15	6.10±0.92	14.98±2.21
中危组	18	5.11±0.95 ^a	16.77±2.08 ^a
高危组	7	4.19±0.68 ^{ab}	18.61±1.52 ^{ab}
F 值		11.640	7.942
P 值		<0.001	0.001

组别	例数(例)	TNF-α (ng/L)	PCT (μg/L)	CRP (mg/L)
低危组	15	17.73±2.21	1.21±0.23	24.97±3.41
中危组	18	19.31±2.47	1.43±0.35 ^a	29.12±3.72 ^a
高危组	7	22.16±1.72 ^{ab}	1.90±0.11 ^{ab}	33.67±1.42 ^{ab}
F 值		9.156	14.520	17.150
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 低危组急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II) < 10 分, 中危组 APACHE II 评分 10 ~ 20 分, 高危组 APACHE II 评分 > 20 分; ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , PCT 为降钙素原, CRP 为 C-反应蛋白; ^a 与低危组比较, $P<0.05$; ^b 与中危组比较, $P<0.05$

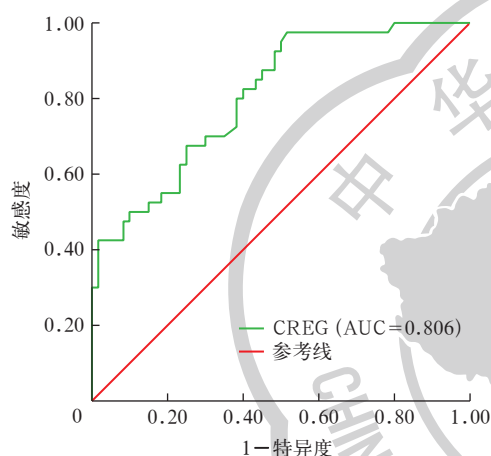
护因素(均 $P<0.05$); 血清 CREG 水平每增加 1 个单位, 发生 ARDS 的风险降低约 61.5%。

2.2.4 CREG 对脓毒症并发 ARDS 的预测价值分析(图 2): ROC 曲线分析结果显示, CREG 预测脓毒症患者并发 ARDS 的 AUC 为 0.806 [95% 置信区间(95% confidence interval, 95%CI) 为 0.713 ~ 0.899]; 最佳截断值为 7.85 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感度 71.43%, 特异度 78.57%。

表 5 脓毒症患者并发 ARDS 影响因素的多因素 Logistic 回归分析

影响因素	β 值	s_e	χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
APACHE II 评分升高	1.325	0.317	17.471	<0.001	3.765	1.141 ~ 12.430
CREG 升高	-0.953	0.297	10.296	0.015	0.385	0.344 ~ 0.432
IL-6 升高	0.985	0.271	13.211	0.009	2.679	1.296 ~ 5.541
TNF- α 升高	1.106	0.354	9.761	0.001	3.024	1.036 ~ 8.827
PCT 升高	1.051	0.308	11.644	0.007	2.862	1.185 ~ 6.915
CRP 升高	1.220	0.309	15.588	<0.001	3.390	1.188 ~ 9.669

注: ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II, CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , PCT 为降钙素原, CRP 为 C-反应蛋白, OR 为优势比, 95%CI 为 95% 置信区间



注: CREG 为细胞 E1A 激活基因阻遏子基因, ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, ROC 曲线为受试者工作特征曲线, AUC 为 ROC 曲线下面积

图 2 CREG 预测脓毒症患者并发 ARDS 的 ROC 曲线

3 讨论

脓毒症 ARDS 尚缺乏特异治疗手段, 肺泡巨噬细胞功能紊乱介导的炎症失衡是其核心病理环节。CREG 作为新型炎症调控因子, 已在多种损伤模型中展现出免疫调节潜力, 但在脓毒症 ARDS 中的作用尚未明确。本研究通过细胞实验与临床样本分析, 系统探讨了 CREG 对肺泡巨噬细胞自噬及极化的调控作用, 并揭示了其临床价值, 以期对脓毒症 ARDS 的机制研究与临床干预提供新方向。

自噬作为巨噬细胞维持稳态的关键机制, 其活性异常与肺部炎症损伤密切相关。Peng 等^[10]证实, 线粒体损伤相关分子模式可诱导 ARDS, 而雷帕霉素通过增强自噬能显著抑制 NOD 样受体蛋白 3 炎症小体激活, 减少炎症因子分泌, 从而减轻肺部炎症与损伤, 为自噬在 ARDS 中的抗炎保护作用提供了直接证据。本研究细胞实验显示, LPS 刺激后肺泡巨噬细胞中 Beclin1 表达及 LC3-II/LC3-I 比值降低, p62 表达升高, 提示脓毒症模型中肺泡巨噬细胞自

噬活性受抑, 与既往研究结果一致^[11]; 过表达 CREG 可逆转 LPS 诱导的自噬抑制, 而干扰 CREG 表达则加剧了自噬活性下降, 明确了 CREG 对肺泡巨噬细胞自噬的正向调控作用。Song 等^[12]在心肌缺血再灌注损伤研究中发现, CREG 可通过激活溶酶体介导的自噬、减少心肌细胞凋亡, 显著缩小梗死面积并改善心功能, 而自噬阻断剂氯喹可逆转其保护效应, 印证了 CREG 通过正向调控自噬发挥组织保护作用的保守机制。另有研究表明, CREG1 可通过调控线粒体自噬维持线粒体质量与功能, 改善骨骼肌运动耐力, 且其作用依赖与热休克蛋白 1 的相互作用以拮抗自身降解, 证实了 CREG 家族蛋白在不同组织中通过调控自噬维持细胞稳态的保守功能^[13]。

巨噬细胞 M1/M2 极化失衡是脓毒症 ARDS 的重要病理基础, M1 型巨噬细胞分泌的促炎因子可加剧炎症风暴, 而 M2 型巨噬细胞则可通过抗炎与修复功能维持肺稳态^[14]。本研究细胞实验显示, LPS 刺激可导致肺泡巨噬细胞 M1 型标志物 CD86 表达升高, M2 型标志物 CD206 表达降低, 提示极化向促炎表型倾斜, 与临床样本中脓毒症 ARDS 患者促炎因子水平升高相呼应; 过表达 CREG 可降低 CD86 表达、升高 CD206 表达, 而 CREG 沉默则呈现相反效应, 证实了 CREG 对肺泡巨噬细胞极化的调控作用, 与巨噬细胞极化的信号调控规律相符。巨噬细胞极化受多条通路协同调控。Zhuang 等^[15]在大肠杆菌感染巨噬细胞模型中发现, 番茄红素可通过抑制 Notch 同源物 1 (Notch homolog 1, NOTCH1)/PI3K/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)/NF- κ B/组蛋白去甲基化酶 JMJD3/干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4) 通路, 下调 M1 型标志物 (CD86、TNF- α)、上调 M2 型标志物 [CD206、精氨酸酶 1 (arginase 1, Arg1)], 促进 M2 型极化以缓解炎症。CREG 可调控 NF- κ B 等炎症通路, 推测其可能通过抑制 NF- κ B 活性减少 M1 型极化, 激活 mTOR 依赖通路促进 M2 型分化, 实现炎症平衡重建^[16-17]。

本研究临床样本分析为 CREG 的病理意义提供了直接证据。结果显示, 脓毒症患者血清 CREG 水平显著低于健康人群, 且脓毒症 ARDS 患者 CREG 水平降低更明显, 提示 CREG 表达下降与脓毒症进展及 ARDS 发生密切相关; 进一步分层分析显示, CREG 水平随 APACHE II 分级升高而逐渐降低, 且与 IL-6、TNF- α 等促炎因子的变化趋势相反, 与细胞实验中 CREG 抑制炎症极化的结果一致, 在体内印证了其

抗炎保护作用。Cheng 等^[18]在对乙酰氨基酚诱导肝损伤研究中发现,肝细胞特异性 CREG1 可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶促进自噬,减轻肝脏损伤与炎症反应,而自噬诱导剂雷帕霉素可逆转 CREG1 缺陷导致的肝损伤易感,证实了 CREG 家族蛋白通过调控自噬发挥组织保护作用的保守机制。Liu 等^[19]在大鼠肾纤维化模型中发现,外源性补充重组 CREG 可上调叉头框蛋白 P1、抑制转化生长因子- β 1 通路,进而改善肾功能,减轻肾纤维化,抑制单核细胞浸润与肾细胞凋亡,印证了 CREG 通过调控炎症与组织修复通路发挥器官保护作用的共性特征。本研究多因素 Logistic 回归分析明确 CREG 升高是脓毒症并发 ARDS 的独立保护因素;ROC 曲线分析表明,CREG 在早期识别脓毒症 ARDS 患者方面具有预测效能。

本研究尚存在一些局限性。首先,细胞模型仅使用了 LPS 单一刺激,与临床上脓毒症复杂的感染环境存在差异。其次,CREG 调控自噬与极化的具体下游信号通路尚未完全阐明。最后,本研究为单中心研究,临床样本量有限,可能对研究结论的外推性产生一定影响。CREG 预测 ARDS 的最佳截断值仍需要在更大规模的多中心队列中验证。未来可在动物模型中进行体内验证,通过给予重组 CREG 蛋白或利用巨噬细胞特异性 CREG 敲除小鼠确认其干预潜力,并深入探索 CREG 与自噬、极化之间的因果联系及精确的分子相互作用机制。

综上所述,本研究通过细胞实验与临床研究双重验证,明确了 CREG 可通过正向调控肺泡巨噬细胞自噬活性、纠正 M1/M2 极化失衡,在脓毒症 ARDS 中发挥保护作用;CREG 升高是脓毒症并发 ARDS 的保护因素,且具有良好的早期预测价值。这一研究结果不仅为脓毒症 ARDS 发病机制提供了全新的理论视角,也为临床寻找脓毒症 ARDS 诊断标志物与靶向治疗靶点提供了直接的实验依据和临床证据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 曹亮: 酝酿和设计实验、起草文案、获取研究经费; 邹芳: 采集数据、分析/解释数据; 张长洪: 实施研究、起草文章; 徐凯伦: 实施研究、统计分析; 李景琦: 分析/解释数据, 统计分析, 行政、技术或材料支持; 赵建清: 对文章的知识性内容作批评性审阅、指导、支持性贡献; 刘建华: 分析/解释数据、指导、支持性贡献

参考文献

- [1] Brandes-Leibovitz R, Riza A, Yankovitz G, et al. Sepsis pathogenesis and outcome are shaped by the balance between the transcriptional states of systemic inflammation and antimicrobial response[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(11): 101829. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101829.
- [2] Qiao XY, Yin JH, Zheng ZH, et al. Endothelial cell dynamics in

- sepsis-induced acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and therapeutic implications[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 241. DOI: 10.1186/s12964-024-01620-y.
- [3] Zhao XJ, Xie JG, Duan CJ, et al. ADAR1 protects pulmonary macrophages from sepsis-induced pyroptosis and lung injury through miR-21/A20 signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(2): 464-485. DOI: 10.7150/ijbs.86424.
- [4] Wang QL, Yang L, Liu ZL, et al. Sirtuin 6 regulates macrophage polarization to alleviate sepsis-induced acute respiratory distress syndrome via dual mechanisms dependent on and independent of autophagy[J]. *Cytotherapy*, 2022, 24(2): 149-160. DOI: 10.1016/j.jcyt.2021.09.001.
- [5] Li Y, Liu YX, Tian XX, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes is a critical determinant of vascular remodeling in response to angiotensin II [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(3): 485-494. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308794.
- [6] Deng J, Han YL, Yan CH, et al. Overexpressing cellular repressor of E1A-stimulated genes protects mesenchymal stem cells against hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis by activation of PI3K/Akt[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(4): 463-473. DOI: 10.1007/s10495-009-0434-7.
- [7] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [8] ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition[J]. *JAMA*, 2012, 307(23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [9] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system[J]. *Crit Care Med*, 1985, 13(10): 818-829. DOI: 10.1097/00003246-198510000-00009.
- [10] Peng W, Peng F, Lou YL, et al. Autophagy alleviates mitochondrial DAMP-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118833. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118833.
- [11] Cui YN, Tian N, Luo YH, et al. High-dose vitamin C injection ameliorates against sepsis-induced myocardial injury by anti-apoptosis, anti-inflammatory and pro-autophagy through regulating MAPK, NF- κ B and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in rats[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(8): 6937-6953. DOI: 10.18632/aging.205735.
- [12] Song HX, Yan CH, Tian XX, et al. CREG protects from myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating myocardial autophagy and apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1893-1903. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.015.
- [13] Song HX, Tian XX, Liu D, et al. CREG1 improves the capacity of the skeletal muscle response to exercise endurance via modulation of mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4102-4118. DOI: 10.1080/15548627.2021.1904488.
- [14] Chen F, Wang N, Liao JB, et al. Esculetin rebalances M1/M2 macrophage polarization to treat sepsis-induced acute lung injury through regulating metabolic reprogramming[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(21): e70178. DOI: 10.1111/jcmm.70178.
- [15] Zhuang CC, Zhang RQ, Bai JG, et al. Lycopene promoted M2 macrophage polarization via inhibition of NOTCH1-PI3K-mTOR-NF- κ B-JMJD3-IRF4 pathway in response to *Escherichia coli* infection in J744A.1 cells[J]. *Arch Microbiol*, 2024, 206(6): 249. DOI: 10.1007/s00203-024-03971-z.
- [16] Peng CF, Han YL, Deng J, et al. Overexpression of cellular repressor of E1A-stimulated genes inhibits TNF- α -induced apoptosis via NF- κ B in mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(4): 601-607. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.100.
- [17] Goto A, Hashimoto M, Yokogawa S, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 enhances skeletal muscle performance through the stimulation of muscle differentiation and Akt-mTOR signaling pathway activation[J]. *PLoS One*, 2025, 20(7): e0328485. DOI: 10.1371/journal.pone.0328485.
- [18] Cheng QY, Wu MM, Wei XL, et al. Hepatocyte cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 protects against acetaminophen-induced liver injury by promoting autophagy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2025, 46(8): 2237-2250. DOI: 10.1038/s41401-025-01532-8.
- [19] Liu ML, Song HX, Tian XX, et al. Recombinant cellular repressor of E1A-stimulated genes protects against renal fibrosis in Dahl salt-sensitive rats[J]. *Am J Nephrol*, 2020, 51(5): 401-410. DOI: 10.1159/000506411.

(收稿日期: 2025-10-21)

(本文编辑: 孙茜)