

• 论 著 •

内质网应激相关因子在脓毒症患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义*

卢 玲¹, 姚 伟^{1△}, 龚光远²

1. 重庆医科大学附属第三医院呼吸内科, 重庆 401120; 2. 重庆市綦江区人民医院重症医学科, 重庆 401420

摘 要:目的 观察内质网应激相关因子在脓毒症患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及临床意义。
方法 以 130 例脓毒症患者为观察组, 50 例健康志愿者为对照组。根据脓毒症患者预后将观察组分为存活组(96 例)和死亡组(34 例)。采用实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹分别检测 PBMC 中内质网应激相关因子[增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、激活转录因子-6(ATF-6)]mRNA 和蛋白表达水平。采用酶联免疫吸附试验法检测部分炎症指标[白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6]和氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)]水平。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析内质网应激相关因子对脓毒症患者预后的评估价值。**结果** 与对照组比较, 观察组患者 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 和蛋白表达水平显著升高, IL-1 β 、IL-6 和 MDA 水平显著升高, 而 SOD 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与存活组比较, 死亡组患者 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 和蛋白表达水平显著升高, IL-1 β 、IL-6 和 MDA 水平显著升高, 而 SOD 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 分别与 IL-1 β ($r = 0.450, P = 0.019; r = 0.493, P = 0.017$)、IL-6($r = 0.413, P = 0.025; r = 0.445, P = 0.019$)、MDA($r = 0.540, P = 0.013; r = 0.590, P = 0.008$)水平呈正相关; 而与 SOD 水平呈负相关($r = -0.514, P = 0.016; r = -0.499, P = 0.017$)。ROC 曲线分析显示, 观察组 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 的曲线下面积分别为 0.852(95%CI: 0.775~0.929)和 0.840(95%CI: 0.755~0.926), 灵敏度分别为 77.27%和 76.92%, 特异度分别为 84.91%和 79.49%。**结论** 内质网应激在脓毒症患者中显著激活, 检测其相关因子对于脓毒症患者的预后评估, 具有一定的临床价值。

关键词: 内质网应激; 脓毒症; 氧化应激; 炎症; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.001 中图法分类号: R459.7

文章编号: 1673-4130(2021)18-2177-05 文献标志码: A

Expression and clinical significance of endoplasmic reticulum stress-related factors in peripheral blood mononuclear cells of patients with sepsis*

LU Ling¹, YAO Wei^{1△}, GONG Guangyuan²

1. Department of Respiratory, Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China; 2. Department of Intensive Care Unit, Qijiang People's Hospital, Chongqing 401420, China

Abstract: Objective To observe the expression and clinical significance of endoplasmic reticulum stress-related factors in peripheral blood mononuclear cells of patients with sepsis. **Methods** 130 patients with sepsis were taken as the observation group and 50 healthy volunteers were taken as the control group. According to the prognosis level of patients with sepsis, the observation group was divided into survival group (96 cases) and death group (34 cases). The mRNA and protein expression levels of endoplasmic reticulum stress-related factors (CHOP, ATF-6) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were detected by qRT-PCR and western blotting. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect some inflammatory (IL-1 β , IL-6) and oxidative stress (SOD, MDA) levels. Endoplasmic reticulum stress-related factors for the evaluation value of

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81600060)。

作者简介: 卢玲, 女, 主治医师, 主要从事脓毒症相关并发症的临床诊治研究。 △ 通信作者, E-mail: lulyb163@163.com。

本文引用格式: 卢玲, 姚伟, 龚光远. 内质网应激相关因子在脓毒症患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(18): 2177-2181.

prognosis of patients with sepsis were analyzed by ROC curve analysis. **Results** Compared with the control group, the expression level of CHOP and ATF-6 mRNA and protein in the PBMC of the observation group were significantly increased, the levels of IL-1 β , IL-6 and MDA were significantly increased, while the level of SOD was significantly reduced, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the survival group, the expression level of CHOP and ATF-6 mRNA and protein in the PBMC of the death group were significantly increased, the level of IL-1 β , IL-6 and MDA were significantly increased, while the level of SOD was significantly reduced, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The PBMC of CHOP and ATF-6 mRNA in the observation group were positively correlated with the level of IL-1 β ($r = 0.450, P = 0.019; r = 0.493, P = 0.017$), IL-6 ($r = 0.413, P = 0.025; r = 0.445, P = 0.019$), MDA ($r = 0.540, P = 0.013; r = 0.590, P = 0.008$), and there was a significant negative correlation with SOD level ($r = -0.514, P = 0.016; r = -0.499, P = 0.017$). ROC curve analysis showed that the AUC of CHOP and ATF-6 mRNA in the PBMC of the observation group were 0.852 (95%CI: 0.775—0.929) and 0.840 (95%CI: 0.755—0.926), respectively, and the sensitivity was 77.27% and 76.92%, respectively, specificity was 84.91% and 79.49%, respectively. **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress is significantly activated in patients with sepsis, and detection of its related factors has certain clinical value for the prognostic evaluation of patients with sepsis.

Key words: endoplasmic reticulum stress; sepsis; oxidative stress; inflammation; prognosis

目前,脓毒症是造成我国重症监护病房患者死亡的主要原因之一。据估计,全世界每年发生 1 800 万例脓毒血症^[1]。以炎症风暴为特征,进而导致多器官功能损伤及衰竭,是脓毒症发生、发展的病理生理学基础^[2]。尽管针对脓毒症的相关研究,近些年已取得了一定进展,但有效的诊断和治疗方法仍相对欠缺。为了降低脓毒症及相关并发症的病死率,更好地明确脓毒症相关的生物学机制至关重要。内质网是负责蛋白质折叠、组装的细胞器,参与了众多生理功能。在应激和炎症状态下,内质网功能受损,引起未折叠的蛋白应答激活,以重建细胞稳态^[3]。但内质网中未折叠蛋白长期积聚,触发内质网应激,会引发细胞凋亡。越来越多的证据表明,内质网应激与众多炎症性疾病及恶性肿瘤的发生及发展相关^[4-5]。本研究拟观察脓毒症患者外周血单个核细胞(PBMC)中内质网应激相关因子表达水平,并分析其与患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 8 月在重庆医科大学附属第三医院(简称本院)就诊的脓毒症患者 130 例(观察组)为研究对象。观察组男 75 例、女 55 例,年龄 31~72 岁、平均年龄(50.5 ± 13.8)岁,体质指数(25.0 ± 3.1)kg/m²。纳入标准:(1)年龄 $> 18 \sim 75$ 岁;(2)所有患者均满足脓毒症诊治指南^[6];对于感染或疑似感染的患者,脓毒症相关序贯器官衰竭(SOFA)评分较基线上升 ≥ 2 分。排除标准:(1)数据不完整或不准确的患者;(2)入院 24 h 内死亡的患者;(3)患慢性疾病的患者如恶性肿瘤、自身

免疫性疾病等;(4)近期接受免疫抑制剂治疗的患者;(5)未签署知情同意书的患者。根据观察组患者预后分为存活组(96 例)和死亡组(34 例)。另选取 50 例健康志愿者为对照组,均来自同期同一医疗机构的健康体检中心,其中男 28 例,女 22 例,年龄 32~70 岁,平均年龄(51.3 ± 14.0)岁,体质指数(25.2 ± 3.5)kg/m²,观察组与对照组在性别、年龄、体质指数等方面比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。该研究获得本院伦理委员会批准,并征得患者家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 检测内质网应激相关因子 mRNA 表达水平 收集所有研究对象外周血 3 mL,提取单个核细胞(PBMC),采用实时定量 PCR 检测内质网应激相关因子 mRNA 表达水平。具体检测方法见相关参考文献[7],简要步骤包括设计引物(引物序列见表 1)、RNA 提取、逆转录、扩增等。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对 mRNA 表达水平。

1.2.2 检测内质网应激相关基因蛋白表达水平 提取各组 PBMC,在 RIPA 裂解缓冲液中进行冰育裂解 20 min,经离心后收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。配置 10%电泳液,进行蛋白免疫印迹,检测内质网应激相关蛋白表达水平。具体操作可见参考文献[8],简要步骤如下:每孔加入等量蛋白,经电泳、转膜、封闭、一抗孵育(抗 CHOP 抗体和抗 ATF-6 抗体均为 1:500,抗 GAPDH 抗体为 1:800)、洗涤、二抗孵育、洗涤及显影等。以 GAPDH 为内参,计算内质网应激

相关蛋白条带与 GAPDH 灰度比值。

表 1 引物序列

引物	正向序列	反向序列
CHOP	5'-CAC AGA CCC TGA ATC AGA AG-3'	5'-CCA CGT GTC TTT TAT CTC CC-3'
ATF-6	5'-CTG TGG TGA AAC CTC CAC CT-3'	5'-CAT GGT GAC CAC AGG AGA TG-3'
GAPDH	5'-GGA CTG ACC TGC CGT CTA G-3'	5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTG AG-3'

注:CHOP 为增强子结合蛋白同源蛋白;ATF-6 为激活转录因子-6。

1.2.3 检测 PBMC 中部分炎性和氧化应激指标 收集所有研究对象空腹静脉血 3 mL,经抗凝离心后,获取血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定不同组间 PBMC 中部分炎性指标[白细胞介素(IL)-1β、IL-6]和氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)]水平。具体检测方法见相关试剂盒说明书,炎性指标试剂盒购自南京建成生物公司,氧化应激指标试剂盒购自武汉博士德生物公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。采用 Spearman 统计方法做相关性分析,Graphpad 软件绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与观察组 PBMC 中内质网应激相关因子 mRNA 及蛋白表达水平比较 与对照组比较,观察组患者 PBMC 中内质网应激相关因子 CHOP 和 ATF-6 mRNA 及蛋白表达水平显著升高(*P* < 0.05),见表 1 及图 1。

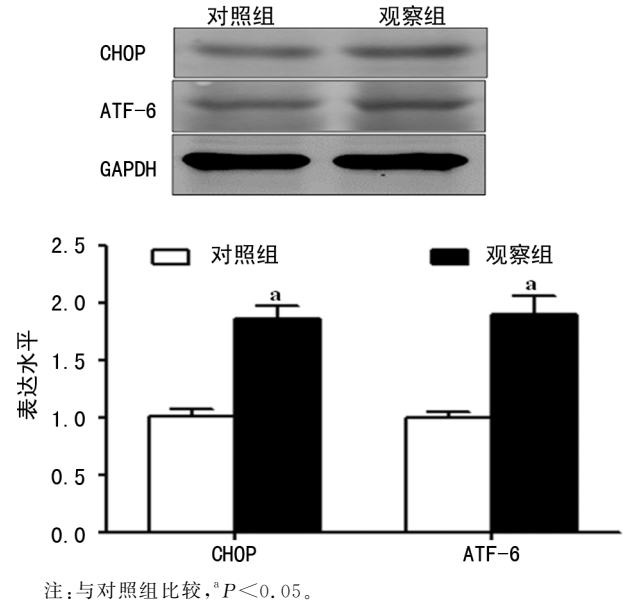
表 1 两组外周血内质网应激相关因子 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	CHOP mRNA	ATF-6 mRNA
对照组	50	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.05
观察组	130	1.89 ± 0.28	1.94 ± 0.22
<i>t</i>		22.101	29.872
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 对照组与观察组 PBMC 中部分炎性及氧化应激指标水平比较 与对照组比较,观察组 PBMC 中部分

炎性指标 IL-1β、IL-6 水平和氧化应激指标 MDA 水平显著升高,而抗氧化应激指标 SOD 水平显著降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

2.3 不同预后组间 PBMC 中内质网应激相关因子 mRNA 和蛋白表达水平比较 与存活组比较,死亡组患者 PBMC 中内质网应激相关因子 CHOP 和 ATF-6 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 3。

2.4 不同预后组 PBMC 中部分炎性及氧化应激指标水平比较 与存活组比较,死亡组 PBMC 中部分炎性指标 IL-1β、IL-6 水平和氧化应激指标 MDA 水平显著升高,而抗氧化应激指标 SOD 水平显著降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 4。



注:与对照组比较,^a*P* < 0.05。
图 1 两组 PBMC 中内质网应激相关因子蛋白表达水平比较

表 2 两组 PBMC 中部分炎性和氧化应激指标水平比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	MDA (μmol/L)	SOD (U/L)
对照组	50	20.50 ± 3.16	18.22 ± 3.10	4.23 ± 0.90	37.12 ± 4.23
观察组	130	27.75 ± 3.80	24.52 ± 3.57	11.35 ± 2.13	22.30 ± 3.45
<i>t</i>		11.990	10.983	22.831	24.192
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 不同预后组 PBMC 中内质网应激相关因子 mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CHOP mRNA	ATF-6 mRNA	CHOP 蛋白	ATF-6 蛋白
存活组	96	1.78±0.16	1.82±0.14	1.80±0.12	1.85±0.11
死亡组	34	1.97±0.13	1.99±0.15	1.94±0.14	1.98±0.13
<i>t</i>		6.229	5.972	5.591	5.640
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 不同预后组 PBMC 中部分炎性和氧化应激指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	MDA (μmol/L)	SOD (U/L)
存活组	96	24.34±2.50	22.24±2.84	9.93±1.34	20.24±1.98
死亡组	34	28.73±2.43	26.56±2.40	12.53±1.85	24.36±2.14
<i>t</i>		8.862	7.919	8.754	10.212
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 相关性分析 观察组 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 分别与 IL-1β($r=0.450, P=0.019; r=0.493, P=0.017$)、IL-6($r=0.413, P=0.025; r=0.445, P=0.019$)、MDA($r=0.540, P=0.013; r=0.590, P=0.008$)水平呈正相关。而与 SOD 水平呈负相关($r=-0.514, P=0.016; r=-0.499, P=0.017$)。

2.6 ROC 曲线分析 观察组 PBMC 中 CHOP 和 ATF-6 mRNA 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.852(95%CI: 0.775~0.929)和 0.840(95%CI: 0.755~0.926),灵敏度分别为 77.27%和 76.92%,特异度分别为 84.91%和 79.49%,见图 2。

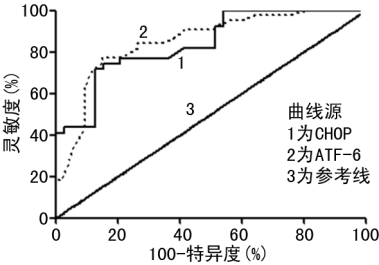


图 2 ROC 曲线分析

3 讨 论

脓毒症引发众多器官功能不全,造成高致死率,是目前临床面临的重大医学问题。脓毒症发病机制极其复杂,包括炎症反应、免疫功能障碍、线粒体损伤、神经内分泌免疫网络异常、自噬及其他病理生理过程,最终导致器官功能障碍^[9]。最近研究表明,内质网应激信号与脓毒症引起的组织细胞死亡有关,在脓毒症细胞及动物模型中,未折叠或错误折叠的蛋白质积聚在内质网中,改变其稳态,导致氧化应激和钙超载,促进内质网应激通路的激活^[10]。抑制内质网应激信号,可显著降低脓毒症引起的细胞凋亡,降低炎

性反应,改善器官功能^[11]。在脓毒症患者人群中,内质网应激相关因子表达水平如何,并且与预后的关系,目前尚未阐明。

研究显示,内质网应激信号通路的激活与多种疾病如糖尿病、高血压、缺血再灌注损伤等发生、发展密切相关^[12-14]。抑制内质网应激,可稳定蛋白质构象,促进未折叠或错误折叠的蛋白质转移出内质网,提示抑制内质网应激信号可能是疾病治疗的重要靶点^[15]。内质网应激主要包含 3 条信号通路如 CHOP 的转录激活,肌醇酶-1 及 ATF-6 激活。脓毒症大鼠中,心脏组织内质网应激主要成分 CHOP 显著上调,可作用于肿瘤坏死因子受体家族或内质网氧化还原 1 样蛋白,引起过量的钙离子从内质网运输至线粒体,触发钙依赖型细胞凋亡通路^[16]。ATF-6 作为内质网未折叠蛋白反应中关键的应激蛋白,当受到压力时被切割为具有转录因子活性的蛋白,并从高尔基体膜转位至细胞核中,激活靶基因的表达,从而参与调控内质网应激反应,维持细胞内蛋白质稳态^[17]。在内质网应激状态下,ATF-6 过度激活可导致与内质网相互作用的多个膜性细胞器稳态的失衡,包括核膜的皱缩、异染色质的丢失及线粒体结构和膜电势的紊乱,促进半胱氨酸蛋白酶-3 凋亡通路激活^[18-20]。本研究结果显示,与对照组比较,脓毒症患者 PBMC 中内质网应激显著激活,同时下游炎性和氧化应激指标显著上调,表明内质网应激促进了下游炎症及氧化应激反应,参与了脓毒症的发生过程。相关研究显示,内质网应激可促进炎症及氧化应激激活,降低大鼠血管舒张反应,升高血压,而给予内质网应激抑制剂处理,可显著逆转上述异常反应^[21]。观察组根据脓毒症预后进行分组,研究结果提示,死亡组患者内质网应激及下游通路显

著较存活组增强。ROC 曲线分析显示, PBMC 中内质网应激相关因子(CHOP 和 ATF-6 mRNA)对脓毒症患者预后的评估价值较高, 提示这两项指标具有一定的临床运用价值。内质网应激的激活参与了脓毒症的发生、发展过程, 其相关标志物不仅可作为评估脓毒症患者预后的有效指标, 还可能为其治疗提供有效的靶点。

脓毒症患者 PBMC 中内质网应激显著激活, 其相关因子可作为评估脓毒症患者预后的有效指标, 但脓毒症患者中, 内质网应激的上游调控机制尚不清楚, 还需动物及细胞实验进一步探索及验证。

参考文献

- [1] ABBAS Q, MEMON F, LAGHARI P, et al. Potentially preventable mortality in the pediatric intensive care unit: findings from a retrospective mortality analysis[J]. *Cureus*, 2020, 12(3): e7358.
- [2] PARK E J, APPIAH M G, MYINT P K, et al. Exosomes in sepsis and inflammatory tissue injury[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(42): 4486-4495.
- [3] 吴鹏波, 吴晓曼, 俞媛洁, 等. 内质网应激对非酒精性脂肪性肝病细胞线粒体凋亡影响研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(17): 2088-2091.
- [4] 朱月琴, 潘学胜, 杜娜, 等. ASIC1a 对急性肺损伤大鼠内质网应激的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3): 396-401.
- [5] 牛琴, 钮红丽, 翟俊英, 等. 丹皮酚通过内质网应激和线粒体损伤途径促进卵巢癌细胞凋亡[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(10): 1991-1998.
- [6] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87.
- [7] 魏卿, 王昌明. NLRP3 炎性小体与重症急性胰腺炎的临床相关性 & 诊断价值[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2020, 15(5): 594-597.
- [8] 欧海燕, 段娅娟, 陈兰. 外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体对脓毒症急性肺损伤患者病情严重程度的诊断价值[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(3): 380-384.
- [9] LELUBRE C, VINCENT J L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 417-427.

- [10] INBARAJ B S, CHEN B H. An overview on recent in vivo biological application of cerium oxide nanoparticles[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(5): 558-575.
- [11] 黄敏, 陶星宇, 贾宝辉, 等. 人参皂苷 Rb1 调控内质网应激对脓毒症小鼠重要脏器的保护作用[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(30): 17-20.
- [12] 符显昭, 黄文华, 王宁莉, 等. 活血解毒降糖方对糖尿病大鼠动脉粥样硬化内质网应激的实验研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(35): 3702-3707.
- [13] 顾静, 赵英, 李海龙, 等. 内质网应激在压力性负荷高血压大鼠血管重构中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(5): 1150-1154.
- [14] 王辉, 嵇富海, 孟晓文, 等. 右美托咪定预处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤时心肌组织内质网应激的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2020, 41(8): 737-741.
- [15] CAKIR I, NILLNI E A. Endoplasmic reticulum stress, the hypothalamus, and energy balance[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(3): 163-176.
- [16] LI L, PENG X, GUO L, et al. Sepsis causes heart injury through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 964-971.
- [17] ZHOU S, YANG J, WANG M, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 173-180.
- [18] LIU D D, ZHANG B L, YANG J B, et al. Celastrol ameliorates endoplasmic stress-mediated apoptosis of osteoarthritis via regulating ATF-6/CHOP signalling pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(6): 826-835.
- [19] KHAN M M, YANG W L, WANG P. Endoplasmic reticulum stress in sepsis[J]. *Shock*, 2015, 44(4): 294-304.
- [20] QIAN W J, CHENG Q H. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced liver injury[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(9): 9990-9997.
- [21] 顾静, 郭超, 车敏, 等. 黄芪对高血压大鼠血管重构中内质网应激反应的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 65-71.

(收稿日期: 2021-02-24 修回日期: 2021-08-21)