

雌激素对脓毒症小鼠心肌半胱氨酸富集分泌蛋白 CRISPLD2 表达的影响

娄云鹏 张晟 林兆奋

200003 上海,第二军医大学长征医院急救科(娄云鹏现在解放军第四〇一医院重症医学科工作)

通讯作者:林兆奋, Email: linzhaofen@smmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.07.002

【摘要】 目的 探讨雌激素对内毒素脂多糖(LPS)诱导脓毒症小鼠心肌中含有 2 个能够结合内毒素的 LCCL 结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白(CRISPLD2)表达的影响。**方法** 选择 7 周龄无特定病原(SPF)Balb/c 小鼠,雌雄各 12 只,将雌性小鼠分别按随机数字表法分为模型组和对照组,每组 6 只。腹腔注射 10% LPS 溶液 5 mg/kg 制备脓毒症小鼠模型,对照组腹腔注射等量生理盐水。24 h 后观察小鼠一般情况,取全血后处死取心脏。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清雌激素水平;制备心肌组织匀浆,提取总蛋白,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 CRISPLD2 表达。双变量相关性采用 Pearson 相关分析。**结果** 制模 24 h 后 24 只小鼠全部存活;模型组动物均出现体毛杂乱、灰暗以及腹泻、食量减少等表现;而对照组动物均无明显异常表现。无论是雄鼠还是雌鼠,模型组与对照组体重及血清雌激素水平比较差异均无统计学意义[体重(g):雄鼠为 24.6 ± 1.8 比 24.5 ± 1.3 ,雌鼠为 18.0 ± 0.8 比 17.5 ± 1.1 ;雌激素(ng/L):雄鼠为 11.93 ± 2.59 比 12.17 ± 3.87 ,雌鼠为 28.20 ± 5.75 比 29.82 ± 6.10 ,均 $P > 0.05$]。CRISPLD2 在雄性与雌性对照组小鼠心肌中的表达差异无统计学意义(灰度值: 1.02 ± 0.19 比 1.00 ± 0.11 , $P > 0.05$);同样雌性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达与相应对照组比较差异无统计学意义(灰度值: 1.05 ± 0.13 比 1.00 ± 0.11 , $P > 0.05$);而雄性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达水平较相应对照组明显降低(灰度值: 0.29 ± 0.08 比 1.02 ± 0.19 , $P < 0.01$),且明显低于雌性脓毒症小鼠($P < 0.01$)。相关分析显示,脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达与血清雌激素水平呈线性相关[$R^2 = 0.736$, 95% 可信区间(95%CI) = $0.560 \sim 0.960$, $P < 0.001$]。**结论** 雌性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达水平与健康小鼠相当,说明雌激素可以使 LPS 诱导的脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达量维持在正常水平。

【关键词】 雌激素; 脓毒症; 心肌; CRISPLD2

基金项目: 国家自然科学基金(81571942)

Effect of estrogen on expression of cysteine-rich secretory protein CRISPLD2 in myocardium of mice with sepsis Lou Yunpeng, Zhang Sheng, Lin Zhaofen

Department of Emergency and Critical Care, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China (Lou Yunpeng is working in the Department of Intensive Care Unit of the 401st Hospital of Chinese People's Liberation Army)

Corresponding author: Lin Zhaofen, Email: linzhaofen@smmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of estrogen on expression of the cysteine-rich secretory protein containing LCCL domain 2 (CRISPLD2) in myocardium of lipopolysaccharide (LPS)-induced mice model of sepsis. **Methods** Totally 12 female and 12 male Balb/c mice of specific pathogen-free (SPF) level with 7 weeks were served as objectives. The female and male mice were randomly divided into model groups and control groups, respectively, with 6 mice in each group. The model of sepsis was reproduced by intraperitoneal injection of 10% LPS (5 mg/kg), and the mice in control groups were injected with the same volume of normal saline. The general condition of mice during experiment was observed at 24 hours after injection. All the mice were sacrificed and the heart was harvested after collecting the whole blood. The concentration of estrogen in serum was determined by double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The myocardial tissue homogenate was prepared at the same time, and the total protein was extracted. The expression level of CRISPLD2 was determined by Western Blot. Pearson correlation analysis was used to analyze the bivariate correlation. **Results** All of the experimental mice survived at 24 hours after injection. The mice in the model groups showed disorder and gray signs of body hair, with diarrhea and decreased appetite. No significant abnormality was observed in the control groups. There was no significant difference in the body weight or concentration of estrogen in serum between model and control group of both female and male mice [body weight (g): 24.6 ± 1.8 vs. 24.5 ± 1.3 in male mice, 18.0 ± 0.8 vs. 17.5 ± 1.1 in female mice; estrogen (ng/L): 11.93 ± 2.59 vs. 12.17 ± 3.87 in male mice, 28.20 ± 5.75 vs. 29.82 ± 6.10 in female mice, all $P > 0.05$]. There was no statistical difference in the expression of CRISPLD2 in myocardium between male control mice and female control mice (gray value: 1.02 ± 0.19 vs. 1.00 ± 0.11 , $P > 0.05$). No significant difference in the expression of CRISPLD2 in myocardium was found between female sepsis mice and female control mice (gray value: 1.05 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.11 , $P > 0.05$). The

expression of CRISPLD2 in myocardium of male sepsis mice was significantly lower than that of male control mice (gray value: 0.29 ± 0.08 vs. 1.02 ± 0.19 , $P < 0.01$), and it was significantly lower than that of female sepsis mice ($P < 0.01$). It was shown by correlation analysis that the expression level of CRISPLD2 in myocardium of sepsis mice was significantly correlated with serum estrogen concentration [$R^2 = 0.736$, 95% confidence interval (95%CI) = $0.560-0.960$, $P < 0.001$].

Conclusions In female mice with sepsis, the expression of CRISPLD2 is comparable to that of female healthy mice. It is suggested that estrogen can maintain the expression of CRISPLD2 in LPS-induced septic mice at the normal level.

【Key words】 Estrogen; Sepsis; Myocardium; CRISPLD2

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81571942)

脓毒症是机体对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍^[1],是导致重症加强治疗病房(ICU)患者非心源性死亡最常见的疾病,总体病死率高达40%以上^[2]。目前已有研究表明,一种含有2个能够结合内毒素的LCCL结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白(CRISPLD2)可以阻断内毒素诱导的炎症“瀑布反应”,从而降低炎症因子水平^[3]。另有研究显示,脓毒症患者的预后存在性别差异^[4]。由此我们设想,性别差异对脓毒症预后的影响可能与不同性别个体CRISPLD2表达水平的差异相关,故进行本研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物:7周龄无特定病原(SFP)Balb/c小鼠,雌雄各12只,体重分别为16.6~19.2 g(雌性)、22.5~26.6 g(雄性),由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号:2008001684572,动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

1.2 动物分组及模型制备:将雌性和雄性小鼠分别按照随机数字表法分为模型组和对照组,每组6只。模型组腹腔注射10%脂多糖(LPS)溶液5 mg/kg制备脓毒症小鼠模型;对照组给予等量生理盐水(NS)。所有小鼠常规饲养24 h后观察其生存情况,取全血后处死取心脏备用。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经过医院伦理审查(审批号:2018-6)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 小鼠血清样本制备:取全血,室温静置30 min使血液凝固,4℃离心10 min,上清液即为待测血清样本,-80℃冻存。

1.3.2 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定小鼠血清雌激素水平:取待测血清样本及全部试剂平衡至室温,将配好的标准品及待测血清依次加入酶标孔中,每孔100 μL,空白孔加入100 μL样品稀释液,37℃静置90 min后弃去孔内液体;除空白孔外,每孔加入100 μL生物素标记抗体,37℃静置60 min后洗板3次;除空白孔外,每孔加入100 μL过氧化物酶标抗体,37℃静置30 min后洗板5次;全

部孔中均加入100 μL显色液,37℃避光静置30 min后再加入100 μL终止液,测定各孔在波长450 nm处的吸光度(A_{450})值,绘制标准曲线后,用待测血清 A_{450} 值查出对应数值,即为雌激素水平。

1.3.3 总蛋白提取及定量:取小鼠全心,用含肝素的NS冲净血液后制备组织匀浆,加入含0.1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液150 μL,低温裂解24 h提取总蛋白。离心取上清液,用BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo Fisher科技公司)测定蛋白浓度,根据测定结果调整每份样本中蛋白浓度一致后备用。

1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定小鼠心肌CRISPLD2表达水平:取100 μL蛋白样本,加入5×加样缓冲液25 μL并混匀,100℃水浴加热10 min后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用加入1%牛血清蛋白(BSA)的含吐温-20的Tris-HCl缓冲液(TBST)室温下封闭2 h后,按照1:500稀释一抗(鼠源性),4℃孵育过夜;用TBST洗膜10 min×3次,按1:2000稀释二抗(羊抗鼠),室温下孵育1 h,再用TBST洗膜10 min×3次。采用电化学发光法(ECL)显色成像,应用Tanon MP软件拍照,应用Image-pro Plus 6.0软件测定蛋白的灰度值,以CRISPLD2与内参蛋白3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的灰度值比值表示CRISPLD2表达量。

1.4 统计学方法:采用GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析并作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数的两两比较采用方差分析(two-way ANOVA),多重比较采用Bonferroni事后检验进行校正;双变量相关性采用Pearson相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况:制模24 h后24只小鼠全部存活,模型组动物均出现体毛杂乱、灰暗以及腹泻、食量减少等表现;对照组动物均无明显异常表现。无论是雄鼠还是雌鼠,模型组与对照组体重比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$;表1)。

表 1 不同性别对照组与脓毒症模型组小鼠基线特征比较

雄性 (n=12)				雌性 (n=12)			
组别	动物数 (只)	鼠龄 (周)	体重 (g, $\bar{x} \pm s$)	组别	动物数 (只)	鼠龄 (周)	体重 (g, $\bar{x} \pm s$)
对照组	6	7	24.5 ± 1.3	对照组	6	7	17.5 ± 1.1
模型组	6	7	24.6 ± 1.8	模型组	6	7	18.0 ± 0.8
t 值	0.203			t 值	0.885		
P 值	0.843			P 值	0.397		

2.2 血清雌激素水平比较(图 1): 在雄性或雌性小鼠中, 对照组与模型组血清雌激素水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

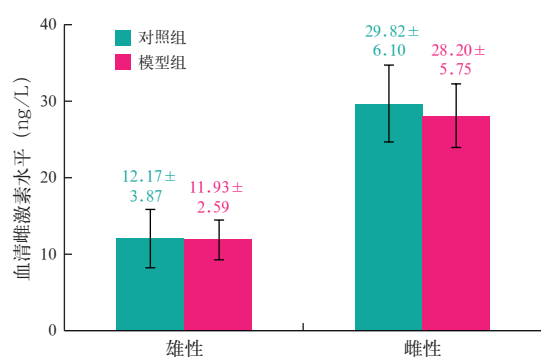
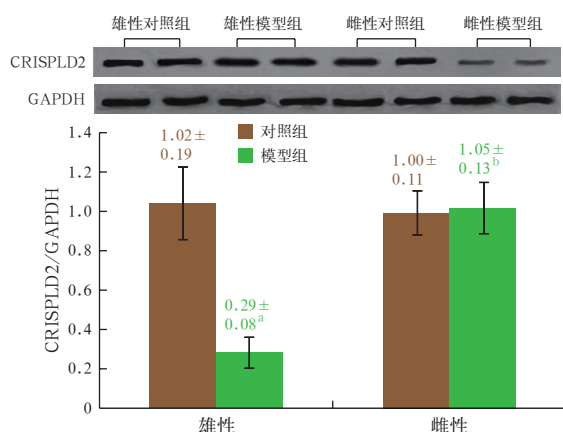


图 1 不同性别对照组与脓毒症模型组小鼠血清雌激素水平比较

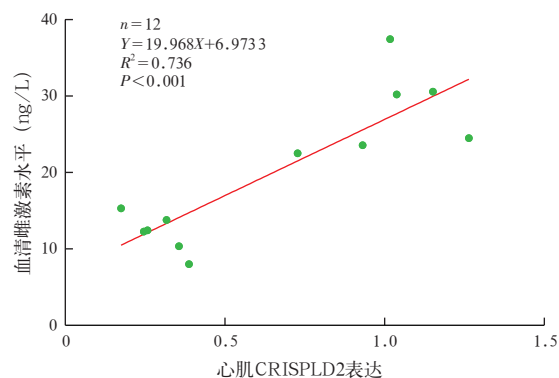
2.3 心肌 CRISPLD2 表达水平比较(图 2): 雌性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 蛋白表达水平与相应对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。雄性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 蛋白表达水平较相应对照组明显降低($P < 0.01$), 且明显低于雌性脓毒症小鼠($P < 0.01$); 但在雌性与雄性对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



CRISPLD2 为含有 2 个能够结合内毒素的 LCCL 结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与同性别对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与雄性模型组比较, ^b $P < 0.01$

图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测不同性别对照组和脓毒症模型组小鼠心肌 CRISPLD2 蛋白表达

2.4 相关性分析(图 3): 以血清雌激素水平和心肌 CRISPLD2 表达建立回归方程, 进行相关性分析, 结果显示, 脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达与血清雌激素水平呈线性相关 [$R^2 = 0.736$, 95% 可信区间 (95%CI) = 0.560 ~ 0.960, $P < 0.001$]。



注: CRISPLD2 为含有 2 个能够结合内毒素的 LCCL 结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白

图 3 脓毒症小鼠血清雌激素水平与心肌 CRISPLD2 表达的相关性

3 讨论

脓毒症是由感染引起的宿主免疫反应失调和器官功能障碍^[5], 是临床常见疾病。人口统计学数据表明, 美国每年有超过 800 万人罹患脓毒症, 其中新生儿感染比例超过 5%^[6]; 中国每年脓毒症患者接近 600 万^[7]。目前, 严重脓毒症和脓毒性休克仍是 ICU 患者重要的非心源性死因, 短期病死率超过 50%^[8]。脓毒症患者的预后存在性别差异。相关临床研究表明, 创伤后合并严重脓毒症的女性患者存活率较男性更高^[9]。Trentzsch 等^[10]对 10 334 例患者的回顾研究显示, 严重创伤后男性多器官功能衰竭 (MOF) 及脓毒症的发病率更高; 进一步亚组分析显示, 16 ~ 44 岁育龄期女性的器官功能更佳。动物实验也表明, 切除卵巢的雌性小鼠及雄性小鼠脓肿、蜂窝织炎和脓毒症的发生率均高于未切除卵巢的雌鼠^[11]; 而应用具有雌激素类似功能的植物激素大豆苷元处理后, 脓毒症小鼠腹水、血液及肺细菌载量均明显降低, 存活率明显升高^[12]。此外, 分子生物学相关研究表明, 当外周单核细胞受 LPS 刺激后, 男性白细胞介素-6 (IL-6) 及降钙素原 (PCT) 水平显著高于女性^[13]。以上证据表明, 雌激素能够减轻脓毒症诱导的炎症反应, 改善预后。

Wang 等^[3]在 2009 年发现了一种含有 2 个 LCCL 结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白, 即 CRISPLD2, 并证实其在小鼠的心脏、小肠、结肠、肺等器官中高水平表达。后续研究表明, CRISPLD2 水平与 PCT、

C-反应蛋白(CRP)、急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II)、序贯器官衰竭评分(SOFA)均呈显著负相关,可作为诊断脓毒症的生物标志物^[14]。刘雪峰等^[15]在动物实验中发现, CRISPLD2 可以改善脓毒症小鼠肺毛细血管通透性,保护肺功能并降低死亡率。目前,关于 CRISPLD2 在脓毒症中的器官保护作用已得到证实,但雌激素对 CRISPLD2 表达的影响以及雌激素通过 CRISPLD2 在脓毒症中的器官保护作用少有研究。本实验初步探讨了雌激素对 CRISPLD2 表达水平的影响,结果显示,雌性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达与相应对照组比较差异无统计学意义;雄性脓毒症小鼠心肌 CRISPLD2 表达较相应对照组明显降低,且明显低于雌性脓毒症小鼠。相关分析显示,心肌 CRISPLD2 表达与血清雌激素水平呈线性相关。

综上所述,雌激素能使 CRISPLD2 在脓毒症小鼠体内呈持续高表达状态,抑制脓毒症早期由于竞争性结合 LPS 导致的 CRISPLD2 水平下降,对脓毒症小鼠具有保护作用,但雌激素影响 CRISPLD2 表达及保护器官功能的分子机制尚需大量实验深入研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 时兢, 宋秀琴, 俞亚芬, 等. 脓症患者临床指标与预后关系的研究 [J]. 临床急诊杂志, 2005, 6 (2): 4-6. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5918.2005.02.002.
- [3] Shi J, Song XQ, Yu YF, et al. The significance of clinical parameters in mortality prediction of patients with severe sepsis [J]. J Clin Emerg, 2005, 6 (2): 4-6. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5918.2005.02.002.
- [4] Wang ZQ, Xing WM, Fan HH, et al. The novel lipopolysaccharide-binding protein CRISPLD2 is a critical serum protein to regulate endotoxin function [J]. J Immunol, 2009, 183 (10): 6646-6656. DOI: 10.4049/jimmunol.0802348.
- [5] Schröder J, Kahlke V, Staubach KH, et al. Gender differences in human sepsis [J]. Arch Surg, 1998, 133 (11): 1200-1205. DOI: 10.1001/archsurg.133.11.1200.
- [6] 江利冰, 李瑞杰, 张斌, 等. 2016 年脓毒症与脓毒性休克处理国际指南 [J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26 (3): 263-266. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.03.004.
- [7] Jiang LB, Li RJ, Zhang B, et al. Guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. Chin J Emerg Med, 2017, 26 (3): 263-266. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.03.004.
- [8] Dugani S, Laxminarayan R, Kissoon N. The quadruple burden of sepsis [J]. CMAJ, 2017, 189 (36): E1128-1129. DOI: 10.1503/cmaj.171008.
- [9] Liao X, Du B, Lu M, et al. Current epidemiology of sepsis in mainland China [J]. Ann Transl Med, 2016, 4 (17): 324. DOI: 10.21037/atm.2016.08.51.
- [10] Tillmann B, Wunsch H. Epidemiology and outcomes [J]. Crit Care Clin, 2018, 34 (1): 15-27. DOI: 10.1016/j.ccc.2017.08.001.
- [11] Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, et al. Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome [J]. Intensive Care Med, 2000, 26 (2): 167-172. DOI: 10.1007/s001340050041.
- [12] Trentzsch H, Nienaber U, Behnke M, et al. Female sex protects from organ failure and sepsis after major trauma haemorrhage [J]. Injury, 2014, 45 Suppl 3: S20-28. DOI: 10.1016/j.injury.2014.08.013.
- [13] Youssef H, Stashenko P. Interleukin-1 and estrogen protect against disseminating dentoalveolar infections [J]. Int J Oral Sci, 2017, 9 (1): 16-23. DOI: 10.1038/ijos.2016.61.
- [14] Parida S, Singh TU, Thangamalai R, et al. Daidzein pretreatment improves survival in mouse model of sepsis [J]. J Surg Res, 2015, 197 (2): 363-373. DOI: 10.1016/j.jss.2015.03.059.
- [15] Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis [J]. Clin Chem, 2004, 50 (8): 1301-1314. DOI: 10.1373/clinchem.2004.032144.
- [16] 王来, 杨秀芬, 张书利, 等. 血清 CRISPLD2 水平对脓毒症患者的诊断及预后评估价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (8): 694-699. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.005.
- [17] Wang L, Yang XF, Zhang SL, et al. Value of serum CRISPLD2 levels for the diagnosis and prognosis evaluation of sepsis patients [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (8): 694-699. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.005.
- [18] 刘雪峰, 瞿金龙, 李文放, 等. CRISPLD2 蛋白对内毒素急性呼吸窘迫综合征小鼠的保护作用 [J]. 海军医学杂志, 2017, 38 (1): 21-23. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0754.2017.01.008.
- [19] Liu XF, Qu JL, Li WF, et al. Protective effect of CRISPLD2 protein on acute respiratory disease syndrome induced by lipopolysaccharide in mice [J]. J Navy Med, 2017, 38 (1): 21-23. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0754.2017.01.008.

(收稿日期: 2018-04-02)

• 科研新闻速递 •

联合生物标志物预测疑似脓毒症危重患者的急性病死率

脓症患者早期病死率和住院病死率均较高。尽管近年来对脓症的诊断标准进行了修订,以提高对病死率的预测效度,但仍然难以确定哪些患者具有最大的死亡风险。有学者进行了一项队列研究,比较了 9 种生物标志物预测临床疑似细菌性脓症患者病死率的应用价值。研究者在一个学术医疗中心外科重症加强治疗病房(ICU)招募了 139 例符合两项或多项全身炎症反应综合征(SIRS)标准,并接受了新的广谱抗菌治疗的受试者,并分析了在疑似脓毒症发作后 24、48 和 72 h $\alpha 2$ -巨球蛋白($\alpha 2$ -MG)、C-反应蛋白(CRP)、铁蛋白、纤维蛋白原、结合珠蛋白、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白 A 和蛋白 P(SAA、SAP)及组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)9 种生物标志物水平。分别根据 14 d 预后和住院存活情况将患者分组,评估单个和组合生物标志物的预测有效性。结果显示:患者 14 d 病死率为 12.9%,住院病死率为 29.5%。14 d 死亡组 SAP 较存活组显著降低,而 t-PA 较存活组显著升高,且这两项指标在住院死亡与存活组间也显示出相同的变化趋势特征(均 $P < 0.05$),而其他指标在各组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明 SAP 和 t-PA 对个体病死率的预测能力最好,且其联合预测效果更佳。研究者据此得出结论:联合生物标志物可预测疑似脓症患者 14 d 死亡风险和总体住院死亡风险, SAP 联合 t-PA 在该队列中表现出最佳的鉴别能力。

喻文, 罗红敏, 编译自《Crit Care Med》, 2018, 46(7): 1106-1113