

Gpr174 对脓毒症肠道菌群和代谢的影响

卫威 余治高 宋振举

复旦大学附属中山医院急诊科, 上海 200032

通信作者: 宋振举, 200032, Email: song.zhenju@zs-hospital.sh.cn

【摘要】目的 探讨 *Gpr174* 对脓毒症小鼠肠道损伤、肠道菌群与代谢物组成的影响。**方法** 将 12 只 8 周龄雄性 C57BL/6 和 *Gpr174*^{-/-} 小鼠随机 (随机数字法) 分为 4 组, 分别为野生 (WT) 组, 敲除 (KO) 组, 野生鼠盲肠结扎穿孔 (WT+CLP) 组和敲除鼠盲肠结扎穿孔 (KO+CLP) 组, 采用盲肠结扎穿孔法建立脓毒症模型; 分别在生理情况下与脓毒症造模后 72 h 收集小鼠粪便, 提取菌群 DNA 并进行扩增, 在对 PCR 产物荧光定量后, 对原始数据进行过滤与质控并筛选差异菌群。利用液相色谱-质谱联用技术, 使用 QuanMET 软件对原始数据进行分析并比对鉴定内源性代谢物。通过 R 语言进行多元回归分析, 筛选相关差异代谢物, 并进一步分析相关代谢通路。**结果** 研究发现, KO-CLP 组小鼠的肠道损伤和炎症反应较 WT-CLP 组减轻, 肠道屏障结构和功能破坏较弱。同时, WT 组与 KO 组小鼠在生理和脓毒症情况下肠道差异菌群组内差异小, 组间差异有统计学意义。生理情况下共筛选出 18 种差异细菌, 差异最显著的包括双歧杆菌、乳酸菌、理研菌、拟杆菌、巴恩斯氏菌、普雷沃特菌、酿乳杆菌、艾克曼菌等, 但脓毒症时则仅存在 2 种差异菌, 分别为瘤胃球菌与普雷沃氏菌。肠道代谢物 PCA 分析表明生理情况下野生组与敲除组小鼠存在组间差异; 而在脓毒症造模后, KO 与 WT 小鼠组间差异不明显。在生理情况下, WT 组与 KO 组小鼠鉴定出 24 种差异代谢产物, 其中差异最显著的为丙氨酸与丙酮二羧酸, 这些差异代谢产物涉及丙氨酸循环、丙氨酸代谢等信号通路。**结论** *Gpr174* 敲除后能缓解脓毒症小鼠的肠道损伤。生理情况下 *Gpr174* 影响肠道菌群与代谢产物。研究结果提示 *Gpr174* 参与肠道菌群与代谢物的调控。

【关键词】 脓毒症; 代谢组学; 微生物组学; G 蛋白偶联受体 174; 肠道损伤, 短链脂肪酸; 免疫反应; 趋化因子受体

基金项目: 国家自然科学基金 (82072214)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.04.012

Effect of Gpr174 on the gut microbiota and metabonomics in sepsis mice

Wei Wei, Yu Zhigao, Song Zhenju

Department of Emergency Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Song Zhenju, Email: song.zhenju@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】Objective To investigate whether deletion of *Gpr174* alleviates gut injuries during sepsis and identify the differential gut microbiota, metabolites and related metabolic pathways between C57BL/6 and *Gpr174*^{-/-} mice in physiological condition and sepsis. **Methods** Twelve 8-week-old male C57BL/6 and *Gpr174*^{-/-} mice were randomly (random number) divided into the following four groups: Wildtype (WT) group, *Gpr174*^{-/-} (KO) group, Wildtype + CLP (WT+CLP) group and *Gpr174*^{-/-} + CLP (KO+CLP) group. Sepsis mice model was established by cecal ligation and puncture (CLP) as previously described. Feces were collected from C57BL/6 and *Gpr174*^{-/-} mice in normal condition and 3 days after CLP. The nucleic acid of stool was extracted and then amplified the V3 V4 region using TransStart FastPfu DNA Polymerase; 16S rDNA gene amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq instrument. After demultiplexing and quality filtering, differential microbiota was identified. Metabonomics was determined by liquid chromatography (LC-MS). Endogenous metabolites were identified by the Feihn metabonomics database. Then, metabolic pathways were further analyzed via KEGG. **Results** The

principal component analysis (PCA) showed a cluster type distribution between the WT group and KO group. The difference between the WT+CLP group and KO+CLP group was significantly reduced after CLP. The differential gut microbiota included *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Allobaculum*, *Bifidobacterium*, *Rikenella*, *Olsenella*, *Barnesiella*, and the differential metabolites included L-Alanine, Hydroxypropionic acid, Oxoglutaric acid. The related signal pathways of differential metabolites were Glucose-Alanine Cycle, Alanine Metabolism and Propanoate Metabolism. **Conclusions** *Gpr174* deletion could alleviate gut injuries during sepsis and change the composition of gut microbiota and metabolites.

【Key word】 Sepsis; Metabonomics; Microbiome; *Gpr174*; Intestinal injury; Short chain fatty acid; Immune response; Chemokine receptors

Fund program: This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82072214)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.04.012

脓毒症时,肠道的炎症反应、缺血和多种抗感染药物的使用导致肠道损伤、肠道菌群发生紊乱和肠道代谢产物发生相应改变,进一步引起多器官功能衰竭,是影响脓毒症预后的重要因素^[1]。G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)目前已经成为脓毒症临床治疗和药物治疗的新靶点^[2]。GPR174是细胞信号转导的重要跨膜蛋白,前期研究发现,GPR174通过调节边缘B细胞及调节性T细胞在脓毒症早起免疫应答中发挥免疫调节作用,影响脓毒症的发病^[3-5]。此外,部分GPCRs可与肠道代谢产物如短链脂肪酸结合以促进结肠上皮增殖,改善肠道屏障功能,从而缓解脓毒症引起的肠道损伤。本研究通过检测*Gpr174*^{-/-}小鼠生理状态及脓毒症状态时肠道菌群及代谢产物的差异,揭示GPR174对肠道微环境的意义,并进一步探究其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、试剂和仪器

健康雄性8周龄C57BL/6小鼠与*Gpr174*^{-/-}小鼠购买于南方模式生物有限公司,饲养于复旦大学附属中山医院中心实验室SPF级动物房。随机数字法将小鼠分为4组,每组各3只,分别为野生组(WT),*Gpr174*敲除组(KO),野生鼠盲肠结扎穿孔造模组(WT+CLP),敲除鼠盲肠结扎穿孔造模组(KO+CLP)。脓毒症小鼠模型的建立如文献所述^[6],分别于造模前及盲肠结扎穿孔造模3d后收集小鼠粪便,并进行16S rDNA测序检测分析与靶向代谢组学分析。本实验对动物操作符合动物伦理学要求(No: 201804001Z)。

1.2 CLP脓毒症小鼠模型的建立

采用盲肠结扎穿孔的方式构建脓毒症小鼠模

型,主要操作步骤如下:将小鼠麻醉后备皮,沿腹白线位置作一长度约为1cm左右的纵行切口,定位盲肠并在距根部二分之一处结扎盲肠,使用22G套管针刺穿盲肠并将粪便挤出,回纳盲肠并逐层缝合切口。最后,在小鼠颈后注射1mL生理盐水抗休克并放置于保温毯上复苏。

1.3 肠道病理分析及细胞因子检测

将小鼠的结肠组织固定于4%的多聚甲醛溶液中,经过常规石蜡包埋后切成厚度为4μm的切片,HE染色后在光学显微镜下观察肠道组织的病变情况。取保存于液氮中的肠道组织组织,使用柱法提取肠道总RNA,按照说明书反转录成cDNA,将cDNA稀释4倍,计算PCR各反应液的量,并加入96孔板中,震荡离心后上机,于qPCR仪上扩增并定量分析。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对肠道组织中目标基因ZO-1及细胞因子TNF-α、IL-6及IL-10的表达进行定量分析。引物序列如下表所示:

Gene	Forwards	Reverse
ZO-1	GATGTTTATGCGGACGGTGG	CAITGCTGTGCTCTTAGCGG
TNF-α	GATCGGTCCCAAAGGGATG	CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG
IL-6	GACAAAGCCAGAGTCTTCAGA	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
IL-10	GTAGAAGTGATGCCCCAGGC	CACCTTGGTCTTGGAGCTTATT

1.4 微生物组学分析

收集小鼠的粪便并保存于液氮中,利用1%琼脂糖凝胶电泳抽提基因组DNA。按指定测序区域,合成带有barcode的特异引物,并进行PCR扩增。在对PCR产物荧光定量后,将Illumina PE250测序得到的PE reads根据overlap关系进行拼接,对样品进行OTU聚类与物种注释,并进行差异分析。

1.5 代谢组学分析

将冻存于液氮中粪便取出并在冰上融解,称取10mg样本于1.5mLEP管中,加入25μL水并用

氧化锆珠匀浆 3 min, 加入甲醇乙腈溶液提取代谢物, 18 000 g 离心 20 min, 将上清加入 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 衍生试剂, 封板, 并在 30 $^{\circ}$ C 下衍生 60 min, 加入 50% 甲醇 350 μ L 稀释样本, 在 -20 $^{\circ}$ C 下静置 20 min, 并在 4 000 g 离心 30 min, 取 135 μ L 上清液进行液相色谱质谱联合分析, 将代谢结构鉴定物的数据处理后, 进行多维统计分析, 结合相关数据库选取潜在差异标志物, 结合相关生物标志物, 采用 MetPA 数据库构建代谢通路, 对数据进行分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 8 进行作图分析。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 方差齐时采用成组 *t* 检验或单因素方差分析。非正态分布数据用中位数 (四分位数) 表示, 采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Gpr174*^{-/-} 小鼠脓毒症造模后肠道损伤减轻

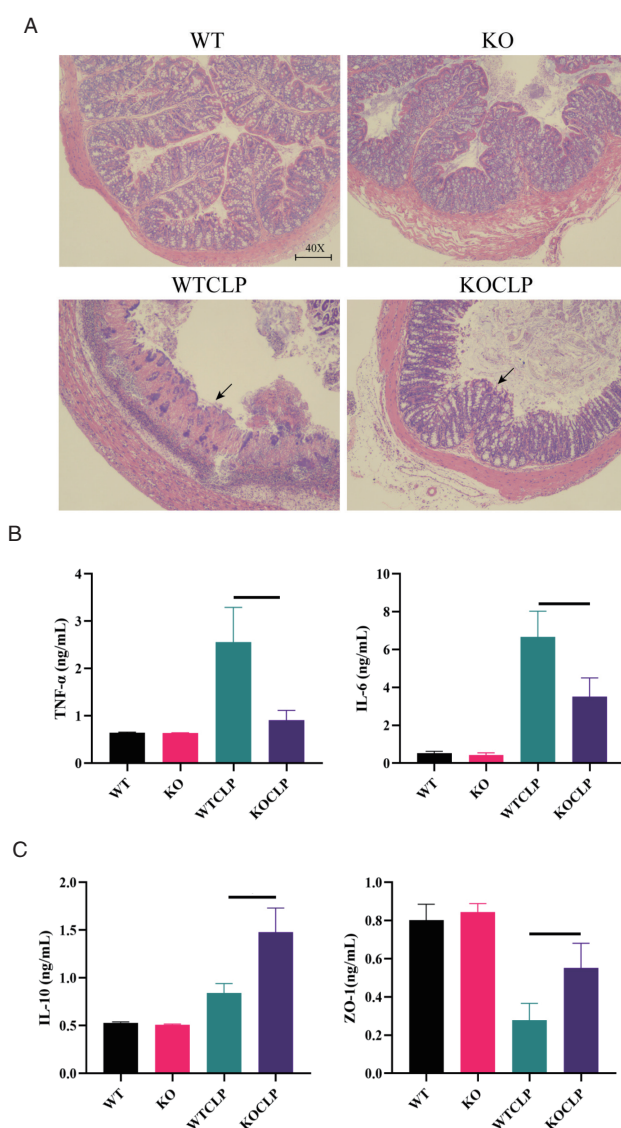
2.1.1 *Gpr174* 敲除减轻了脓毒症小鼠的肠道损伤 生理情况下, WT 组与 KO 小鼠肠道组织病理未见明显损伤, CLP 造模 3 d 后, 肠道组织病理切片显示, 脓毒症野生小鼠肠道绒毛完整性与肠隐窝明显破坏, 肠道上皮细胞与杯状细胞破坏并伴有淋巴细胞浸润。与 WT+CLP 小鼠相比, KO+CLP 小鼠肠道检测病理提示肠道绒毛完整性较好, 隐窝破坏减少, 肠道上皮细胞与杯状细胞破坏较少 (图 1A), 肠道损伤相比于野生小鼠明显减轻。

2.1.2 *Gpr174* 敲除降低了 CLP 小鼠的肠道炎症反应 生理情况下, 野生小鼠与 *Gpr174*^{-/-} 小鼠肠道组织的细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达并无差异 (无统计学意义 ($P > 0.05$))。CLP 造模 3 天后, WT 组与 KO 组小鼠肠道组织促炎因子 TNF- α 与 IL-6 及抑炎因子 IL-10 表达水平较生理情况明显升高 ($P < 0.05$)。其中 KO 组小鼠促炎因子 TNF- α 与 IL-6 表达水平较野生鼠降低, 而抑炎因子 IL-10 水平较野生鼠增高 ($P < 0.05$) (图 1B)。

2.1.3 *Gpr174* 敲除减轻了 CLP 小鼠的肠道屏障破坏 生理情况下, WT 组与 KO 组小鼠肠道的紧密连接蛋白 ZO-1 水平并无差异 (无统计学意义 ($P > 0.05$))。CLP 造模 3 天后, 两组小鼠 ZO-1 表达水平较生理水平明显降低, 其中敲除鼠 ZO-1 表达较野生鼠显著增加 ($P < 0.05$) (图 1C)。

2.2 *Gpr174*KO 组小鼠生理及脓毒症时肠道菌群组成变化

2.2.1 WT 组与 KO 组小鼠生理及造模后菌群主成分分析 主成分分析是通过比较样品之间的距离远近来反映不同微生物群落在物种多样性方面的相似程度, 距离越近, 菌群相似度越高。主成分分析结果表明 WT 组与 KO 组小鼠在 PCoA1 = 68.88% 分为左右两个互不干扰的微生物群, 在 PCoA2 = 14.62% 分为上下两个互不干扰的微生物群, 表明这两组的肠道菌群组成具有差异, 而 WT+CLP 组与 KO+CLP 组间的差异则明显减小, 存在交叉现象 (图 2A)。



A: 四组小鼠肠道黏膜 HE 染色 (箭头所示为肠道黏膜损伤); B: 四组小鼠肠道炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平; C: 四组小鼠肠道紧密连接蛋白 ZO-1 表达水平

图 1 *Gpr174* 敲除后改善脓毒症肠道损伤

Fig. 1 Deletion of *Gpr174* alleviated gut injuries in sepsis mice

2.2.2 WT 组与 KO 组小鼠生理及造模后的差异菌群 生理情况下, WT 组与 KO 组小鼠的肠道菌群存在差异。在生物学分类为门水平, *Gpr174*KO 组相比于 WT 组小鼠放线菌门的相对丰度上升(图 2B)。而在属水平上, KO 组相比于 WT 组小鼠乳酸菌、拟杆菌、*Barnesiella* 菌、理研菌的相对丰度下降, 而双歧杆菌、艾克曼菌、酿乳杆菌、与 *Allobaculum* 菌的相对丰度上升 ($P < 0.05$) (图 2C)。而 CLP 造模后, KO+CLP 组相比于 WT+CLP 组小鼠瘤胃球菌与普雷沃氏菌的丰度升高 ($P < 0.05$) (图 2D)。

2.3 *Gpr174*^{-/-} 小鼠生理及脓毒症时肠道代谢组成变化

2.3.1 WT 组与 KO 组小鼠生理及造模后代谢产物主成分分析 如图 3A 的主成分分析结果所示, 生理状态下, 在主坐标 PCoA1 = 66.79% 时 WT 组与 KO 组小鼠分为左右两个互不干扰的群落, PCoA1 = 25.30% 时野生鼠与敲除鼠分为上下两个互不干扰的群落, 表明野生鼠与敲除鼠粪便代谢网络存在显著差异, 而 WT+CLP 组与 KO+CLP 组的代谢网络则存在交叉现象, 差异明显减小。

2.3.2 差异代谢物筛选结果 使用非靶向代谢组学分析肠道代谢产物, WT 组与 KO 组小鼠共鉴定出 24 种差异代谢产物, 而 WT+CLP 组与 KO+CLP 组小鼠共鉴定出 13 种差异代谢产物。WT 组与 KO 组小鼠的粪便差异代谢标志物以氨基酸与短链脂肪酸为

主, 其中含量多且差异最显著的两种代谢产物分别为丙氨酸与丙酮二羧酸, 并且 WT 组的含量均高于 KO 组(图 3C)。在脓毒症造模后, WT+CLP 组与 KO+CLP 组小鼠相比, 肠道差异代谢物甲基丙二酸含量明显下降, 而左旋缬氨酸表达量上升(图 3D)。2.3.3 代谢通路分析结果 对野生鼠与敲除鼠肠道代谢标志物进行通路分析, 筛选出差异最显著的前 20 条通路, 发现野生鼠与敲除鼠所匹配的代谢通路包括丙氨酸循环、丙氨酸代谢、丙酸代谢、谷胱甘肽代谢、鸟氨酸循环、天冬氨酸穿梭、 β -丙氨酸代谢、天冬氨酸代谢、亚麻酸与亚油酸代谢等信号通路(图 3B)。

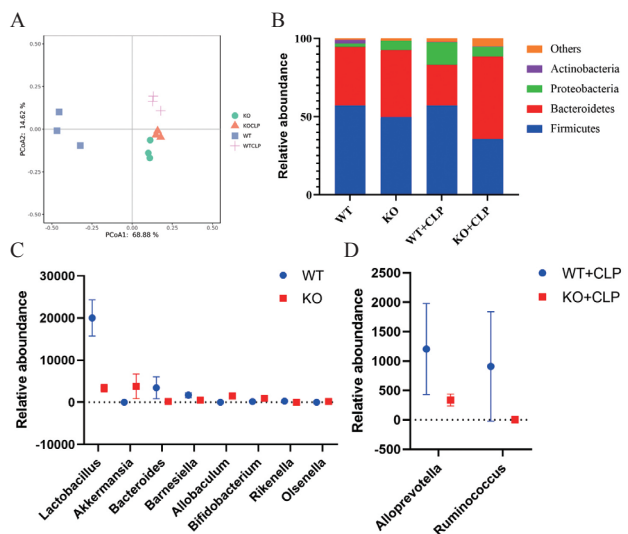


图 2 WT 鼠与 KO 鼠在生理与脓毒症时肠道菌群构成
Fig. 2 Composition of gut microbiota between WT and KO mice in health and sepsis

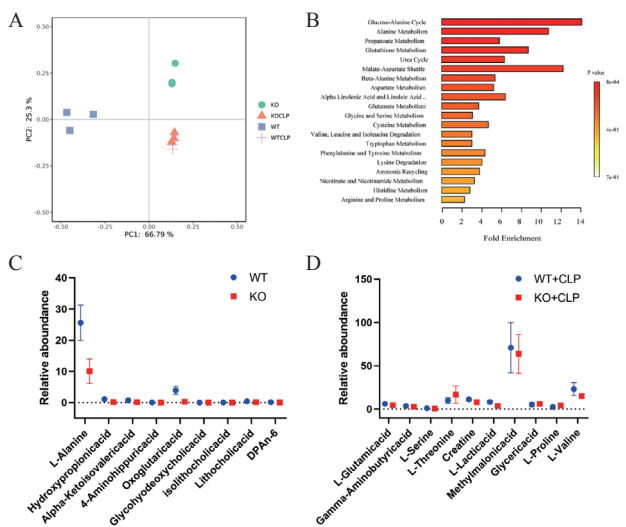


图 3 WT 鼠与 KO 鼠在生理与脓毒症时肠道代谢产物构成
Fig. 3 Composition of gut metabolites between WT and KO mice in health and sepsis

3 讨论

近期课题组研究发现 *Gpr174* 敲除能通过影响边缘 B 细胞与 Treg 细胞显著提高脓毒症小鼠的生存率^[3-4]。本研究发现敲除鼠脓毒症造模后肠道损伤显著减轻, 隐窝破坏减轻, 杯状细胞数量明显多于野生鼠。脓毒症小鼠肠道组织的细胞因子表达谱发生变化, *Gpr174* 敲除促炎因子 TNF- α 与 IL-6 的分泌量明显低于野生鼠, 而抑炎因子 IL-10 则高于野生鼠。在脓毒症肠道损伤中, 过强的免疫反应会加重肠道损伤, 并且破坏肠道的屏障功能^[6], 并引起肠道紧密连接蛋白 ZO-1 的表达量下降。肠道的屏障功能与免疫反应与肠道微环境密切相关, 为

了探讨 *Gpr174* 敲除是否会改变肠道菌群与代谢物, 分别在生理情况下与 CLP 造模后采集小鼠粪便进行微生物与非靶向代谢组学分析。

目前的研究已经表明脓毒症会导致肠道微生物组成改变, 并且会加重多器官功能衰竭^[7,8]。脓毒症期间肠道菌群的多样性丧失, 某个耐药菌或机会致病菌如梭状芽胞杆菌或肠球菌会不断分裂增殖并在肠道中占绝大多数, 而一些在健康人肠道中的菌属如粪杆菌、普氏菌、瘤胃球菌等则会消失。有研究表明, 肠道微生物组成的多样性越高, 肠道稳态的弹性越高, 越不容易受到破坏^[9], 而本研究结果也表明 *Gpr174* 敲除鼠的肠道菌群多样性远远多于野生鼠, 丰富的肠道菌群网络能增强不同微生物群落的交互作用, 艾克曼菌在敲除鼠中其丰度上升, 在体外实验中, 它能黏附肠道上皮细胞, 增加肠道上皮完整性, 巩固肠道屏障功能^[10]; 此外, 它还具有代谢肠道内毒素^[11], 参与肠道免疫调节并抑制炎症^[12]。在 CLP 造模后, 敲除鼠和野生鼠的差异菌群减少, 可能是由于生理下肠道的益生菌在脓毒症时消耗, 并无法适应已经改变的肠道微环境。

肠道代谢产物是一种具有类似激素功能的化合物, 由肠道菌群大量分解代谢产生, 能够进入间质组织及血液循环, 作用于不同组织器官并发挥相应作用。其中短链脂肪酸作为代谢产物重要的组成部分, 是肠道中碳水化合物和蛋白质经细菌发酵的主要产物。临床研究表明, 与危重患者组相比, 丙酸、乙酸、丁酸、异丁酸浓度均显著低于对照组^[13]。产生短链脂肪酸的细菌包括双歧杆菌、丙酸杆菌、真杆菌、艾克曼菌、梭状芽胞杆菌和普雷沃特菌等, 而双歧杆菌、链球菌及艾克曼菌的丰度在敲除鼠中均有上升^[14], 而能产生 γ -氨基丁酸等抑制性神经递质的乳酸菌的丰度则有所下降^[15]。在肠道代谢产物中, 丁酸在 KO 组小鼠中的表达量略高于 WT 组小鼠, 有研究表明短链脂肪酸能为肠道上皮细胞提供能量并促进细胞的增殖分化等, 进而维持肠道屏障的完整性^[16-17]。大量文献表明脓毒症不仅表现为多器官功能衰竭, 同时存在着严重的氨基酸与糖代谢与线粒体功能紊乱。有研究表明脓毒症时机体的氧化磷酸化水平下降, 猜测是由于线粒体氧化损伤所致, 或是由于自噬等细胞保护途径增加而导致线粒体活性下降^[18-19]。

G 蛋白偶联受体与肠道菌群及代谢产物关系密切, 其交互对话机制共同影响肠道稳态与炎症反应。在小鼠体内补充 SCFAs 能增加 GPR43 与 GPR41

的表达, 同时会增加肠道菌群中拟杆菌门的比例, 降低厚壁菌门的比例^[20]。但 *Gpr174* 敲除影响小鼠肠道菌群和代谢物组成的机制尚未明确, 需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(2): 135-143. DOI:10.1016/S2468-1253(16)30119-4.
- [2] Rehman A, Baloch NU, Morrow JP, et al. Targeting of G-protein coupled receptors in sepsis[J]. Pharmacol Ther, 2020, 211: 107529. DOI:10.1016/j.pharmthera.2020.107529.
- [3] Zhu M, Li C, Song ZJ, et al. The increased marginal zone B cells attenuates early inflammatory responses during sepsis in *Gpr174* deficient mice[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 106034. DOI:10.1016/j.intimp.2019.106034.
- [4] Qiu D, Chu X, Hua L, et al. *Gpr174*-deficient regulatory T cells decrease cytokine storm in septic mice[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 233. DOI:10.1038/s41419-019-1462-z.
- [5] 王建李, 仇冬则, 胡延妍, 等. *GPR174* 通过调控炎症反应影响汉族人群脓毒症的易感性 [J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29(6): 815-819. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.06.015.
- [6] 赵鹏. 脓毒症与肠屏障功能关系的研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(7): 516-518. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2019.07.014.
- [7] 颜骏, 蔡燕, 张清艳, 等. 脓毒症早期肠道菌群失调相关危险因素及其对预后的影响 [J]. 中华危重症医学杂志 (电子版), 2020, 13(5): 328-333. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2020.05.002.
- [8] Duan LW, Qu JL, Wan J, et al. Effects of viral infection and microbial diversity on patients with sepsis: a retrospective study based on metagenomic next-generation sequencing[J]. World J Emerg Med, 2021, 12(1): 29-35. DOI:10.5847/wjem.j.1920-8642.2021.01.005.
- [9] Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4): 260-270. DOI:10.1038/nrg3182.
- [10] Reunanan J, Kainulainen V, Huuskonen L, et al. *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(11): 3655-3662. DOI:10.1128/aem.04050-14.
- [11] Lukovac S, Belzer C, Pellis L, et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids[J]. mBio, 2014, 5(4): e01438-e01414. DOI:10.1128/

- mBio.01438-14.
- [12] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(22): 9066-9071. DOI:10.1073/pnas.1219451110.
- [13] Valdés-Duque BE, Giraldo-Giraldo NA, Jaillier-Ramirez AM, et al. Stool short-chain fatty acids in critically ill patients with Sepsis[J]. J Am Coll Nutr, 2020, 39(8): 706-712. DOI:10.1080/07315724.2020.1727379.
- [14] MacFarlane GT, MacFarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health[J]. J AOAC Int, 2012, 95(1): 50-60. DOI:10.5740/jaoacint.sge_macfarlane.
- [15] Barrett E, Ross RP, O' Toole PW, et al. Γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(2): 411-417. DOI:10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x.
- [16] Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease[J]. Digestion, 2016, 93(1): 59-65. DOI:10.1159/000441768.
- [17] Macia L, Tan J, Vieira AT, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6734. DOI:10.1038/ncomms7734.
- [18] Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1777(7/8): 763-771. DOI:10.1016/j.bbabo.2008.04.024.
- [19] Crouser ED, Julian MW, Huff JE, et al. Carbamoyl phosphate synthase-1: a marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis[J]. Crit Care Med, 2006, 34(9): 2439-2446. DOI:10.1097/01.CCM.0000230240.02216.21.
- [20] Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis[J]. Pharmacol Ther, 2016, 164: 144-151. DOI:10.1016/j.pharmthera.2016.04.007.

(收稿日期: 2020-09-19)

(本文编辑: 何小军)

骨桥蛋白对脓毒症中高迁移率族蛋白 B1 表达水平的影响

刘明珠^{1,2} 张方杰² 李湘民²

¹ 长沙市中心医院急诊科, 410004; ² 中南大学湘雅医院急诊科, 长沙 410008

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.04.013

脓毒症是由感染引起的生理、病理和生化异常的综合征。宿主免疫系统在受到外部病原体感染后介导促炎反应, 表现为全身炎症反应综合征^[1]。一些流行病学研究表明, 脓毒症患者, 特别是合并多种并发症的, 病死率高。在土耳其的一项国家多中心前瞻性研究中, 分析的 1 499 例患者严重脓毒症和脓毒症休克的病死率(分别为 55.7% 和 70.4%) 显著高于普通感染患者^[2-3]。

高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一组染色体结合蛋白, 可由被活化的巨噬细胞释放到细胞外, 在没有外来病原体入侵的情况下, HMGB1 可以激活自然免疫炎症反应^[4]。随着 HMGB1 晚期促炎作用的发现, 它被认为是一种重要的炎症介质和脓毒症的潜在治疗靶点^[5-6]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种高度磷酸化的糖蛋白, 它可以促进免疫介导疾病和炎症性疾病的进展, 调节宿主对感染的反应^[7]。既往研究表明, 血清 OPN 水平在脓毒症患者中显著升高, 可能作为炎症介质在疾病进展中发挥重要作用^[8], 但 OPN 参与脓毒症病理过程的具体调控机

制及可能涉及的细胞生物学改变尚不清楚。最近研究发现, 在丙型肝炎病毒引起的肝纤维化患者中, OPN 和 HMGB1 的表达水平存在相关性, 且 OPN 被认为是 HMGB1 的上游因子, OPN 可以诱导 HMGB1 并在 HSCs 中调控 I 型胶原的合成^[9]。然而, 关于它们之间的关系及其作用机制的研究却很少。本实验旨在通过体外培养巨噬细胞, 观察 OPN 水平对脓毒症中 HMGB1 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW264.7 细胞系购自上海细胞库。OPN 购自 R & D System 公司。脂多糖购自 Sigma-Aldrich 公司。IL-1 β ELISA 试剂盒购自北京四正白公司。引物由上海圣工公司合成提供。Monad qPCR 试剂盒购自苏州 mona 生物技术公司。mRNA 逆转录试剂盒购自北京天根生化技术公司。HMGB1 和 Tubulin 小鼠单克隆抗体购自 Abcam 公司。

1.2 分组干预