

• 基础研究 •

热休克蛋白 A12A 对内毒素血症肝损伤的作用及机制研究

王诏鹤, 孔秋月, 丁正年*

南京医科大学第一附属医院麻醉与围术期医学科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 研究热休克蛋白 A12A (heat shock protein A12A, HSPA12A) 对内毒素血症肝损伤的影响及机制。方法: ①采用脓毒症小鼠肝组织 RNA 测序的公共数据库, 以生物信息学手段分析 *Hspa12a* 和多种载脂蛋白的 mRNA 表达变化。②采用 6~8 周龄 *Hspa12a* 基因敲除 (*Hspa12a* knockout, *Hspa12a*^{-/-}) 鼠和野生型 (wild type, WT) 鼠, 腹腔注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 5 mg/kg 诱导内毒素血症, 以生理盐水 (normal saline, NS) 注射小鼠为对照组, 分为 NS-WT 组、NS-*Hspa12a*^{-/-} 组、LPS-WT 组和 LPS-*Hspa12a*^{-/-} 组; LPS 作用 6 h 后, 收集肝组织, HE 染色观察肝脏组织病理变化; 免疫印迹和 RT-PCR 分析其中 HSPA12A、ApoA1、ApoB、ApoM 表达水平; 分离血清, 测定肝功能标志物丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平以及高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平。③WT 鼠原代肝细胞过表达 *Hspa12a* 后, 使用 LPS (500 ng/mL) 作用于肝细胞模拟内毒素血症肝损伤模型, 6 h 后检测肝细胞培养上清的 ALT 和 AST 水平。④根据是否发生脓毒症肝损伤将患者分为脓毒症肝损伤组和对照组, 比较两组患者 ALT、AST、HDL-C 和 LDL-C 的差异。结果: ①生物信息学分析显示, 脓毒症小鼠肝脏 *Hspa12a*、*ApoA1*、*ApoB* 和 *ApoM* 的 mRNA 表达下降。②与 NS-WT 组相比, LPS-WT 组肝组织出现明显损伤 ($P < 0.001$)、炎症病灶数量增多 ($P < 0.01$)、血清 ALT ($P < 0.05$) 和 AST ($P < 0.01$) 升高, 同时肝组织中 HSPA12A 表达显著下降 ($P < 0.05$); 而与 LPS-WT 组相比, LPS-*Hspa12a*^{-/-} 组肝脏病理变化更严重 ($P < 0.05$) 且血清 ALT ($P < 0.01$) 和 AST ($P < 0.05$) 水平升高, HDL-C 和 LDL-C 水平下降 ($P < 0.01$), 肝组织载脂蛋白 (ApoA1、ApoB、ApoM) 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。③体外实验中 LPS 作用使肝细胞培养上清中 ALT 和 AST 水平升高 ($P < 0.001$), 而过表达 *Hspa12a* 能够减轻 LPS 作用引起的 ALT 和 AST 水平升高 ($P < 0.01$)。④临床数据显示, 出现脓毒症肝损伤的患者血浆中 ALT 和 AST 水平相对对照组显著升高 ($P < 0.001$), HDL-C 和 LDL-C 水平显著下降 ($P < 0.001$)。结论: 内毒素血症导致肝脏 HSPA12A 表达下调, 其介导了内毒素血症肝损伤的发生, 过表达 *Hspa12a* 能够保护内毒素血症引起的肝损伤, 该作用可能与维持肝脏载脂蛋白及脂蛋白稳态有关。

[关键词] 热休克蛋白 A12A; 内毒素血症; 肝损伤; 载脂蛋白

[中图分类号] R631.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)05-615-11

doi: 10.7655/NYDXBNSN231186

Study on the role and mechanism of heat shock protein A12A in hepatic injury induced by endotoxemia

WANG Zhaohe, KONG Qiuyue, DING Zhengnian*

Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role and mechanism of heat shock protein A12A (HSPA12A) in hepatic injury induced by endotoxemia. **Methods:** ①The mRNA expression changes of *Hspa12a* and multiple apolipoproteins were analyzed by bioinformatics using a public database of RNA sequencing results from septic mice liver tissue. ②Endotoxemia was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg) using 6–8-week-old *Hspa12a* knockout (*Hspa12a*^{-/-}) mice and wild-type (WT) mice. Mice treated with normal saline (NS) served as controls. Animals were divided into four groups, NS-WT group, NS-*Hspa12a*^{-/-} group, LPS-WT group, and LPS-*Hspa12a*^{-/-} group. Six hours after LPS treatment, liver tissues were collected to evaluate the tissue damage by HE and analyze the expression levels of HSPA12A, ApoA1, ApoB, and ApoM by immunoblotting and RT-PCR. Serum was separated

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20201087)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhengnianding@njmu.edu.cn

for measuring the levels of liver function markers (alanine aminotransferase, ALT; aspartate aminotransferase, AST) and lipoproteins (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C; low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C). ③Primary hepatocytes overexpressed *Hspa12a* were treated with LPS (500 ng/mL) to emulate endotoxemia induced liver injury. Six hours after LPS treatment, culture medium was collected for measuring levels of ALT and AST. ④Patients were divided into the sepsis induced liver injury group and the control group according to whether the septic liver injury occurred. ALT, AST, HDL-C and LDL-C levels were collected and compared between the two groups. **Results:** ①Bioinformatic analysis showed that the levels of *Hspa12a*, *Apoa1*, *Apob* and *Apom* mRNA were decreased in livers of septic mice. ②Compared with NS-WT mice, LPS-WT mice displayed obvious histopathological injury in liver tissues ($P < 0.001$) and the number of inflammatory foci was increased ($P < 0.01$) along with the elevated serum ALT ($P < 0.05$) and AST ($P < 0.01$) activities. At the same time, the expression of HSPA12A protein in liver was decreased ($P < 0.05$). However, compared with LPS-WT mice, LPS-*Hspa12a*^{-/-} mice showed more severe pathological damage of liver tissues ($P < 0.05$), along with higher ALT ($P < 0.01$) and AST ($P < 0.05$) levels and lower HDL-C and LDL-C levels ($P < 0.01$). At the same time, the expression levels of hepatic apolipoproteins (ApoA1, ApoB, ApoM) were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ③*In vitro*, ALT and AST levels in culture medium of hepatocytes were significantly increased after LPS treatment ($P < 0.001$). However, overexpression of *Hspa12a* alleviated the increases of ALT and AST levels ($P < 0.01$). ④Clinical results suggested that compared with the control group, the sepsis induced liver injury group showed significantly higher serum ALT and AST levels ($P < 0.001$). In contrast, HDL-C and LDL-C levels were significantly lower ($P < 0.001$). **Conclusion:** Endotoxemia leads to downregulation of hepatic HSPA12A expression, which mediates the development of endotoxemic liver injury. However, overexpression of *Hspa12a* can protect liver injury induced by endotoxemia. The action of HSPA12A may involve the regulation of hepatic apolipoprotein expression and serum lipoprotein cholesterol levels.

[Key words] heat shock protein A12A; endotoxemia; hepatic injury; apolipoprotein

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(05): 615-625]

脓毒症是指由宿主对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍,是世界范围内死亡的主要原因^[1-2]。肝脏是脓毒症最常累及的器官,约46%的脓毒症患者伴有肝功能不全,病死率更高^[3]。因此,探究脓毒症所致肝损伤的分子机制,寻找其潜在靶点具有重要的临床意义。

脓毒症过程中会出现脂蛋白和脂质代谢异常,反过来脂蛋白和脂质代谢异常也可通过炎症以及氧化应激等途径加重脓毒症造成的脏器损伤^[4-5],研究表明脓毒症期间胆固醇下降常导致多器官功能障碍以及不良预后^[6-8]。探讨脂质代谢与脓毒症之间的关系,有助于更好地了解脓毒症的发病机制,制定有效的治疗策略。

热休克蛋白 A12A (heat shock protein A12A, HSPA12A) 是 HSP70 家族的不典型成员。本课题组前期研究显示, HSPA12A 具有多种生物学功能,例如保护缺血性脑损伤和缺血/再灌注肝损伤^[9-10]。值得关注的是, HSPA12A 可减轻内毒素所致肺损伤^[11], 而 *Hspa12a* 基因敲除对高脂饮食所致血浆脂蛋白增高具有抑制作用^[12]。然而,在内毒素血症期间, HSPA12A 能否通过调控脂蛋白、进而影响肝损伤尚不明确。本研究旨在明确 HSPA12A 在内毒素所致肝损伤中的病理生理作用,并初步探讨该作用

是否与脂质代谢有关,以期进一步揭示内毒素血症肝损伤的发病机制,为发现新的治疗靶点提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

Hspa12a 基因敲除 (*Hspa12a* knockout, *Hspa12a*^{-/-}) 鼠由本课题组前期构建完成^[9]。本研究采用 6~8 周雄性小鼠 (SPF 级) 用于实验,对照组采用同窝所生、同性别、野生型 (wild type, WT) 鼠。实验动物饲养于 SPF 级动物实验房中,温度控制在 (22±2)℃, 12 h 光照/黑暗循环,自由饮食,饲料由南京大学模式动物研究所提供。本实验已获得南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准 (编号: SYXK-2015-0015)。

1.1.2 试剂

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (Sigma-Aldrich 公司, 美国), DMEM 培养基、胎牛血清、IV 型胶原酶 (Gibco 公司, 美国), Hank's 缓冲盐溶液 (安徽白鲨生物科技有限公司), GAPDH 抗体 (Bioworld 公司, 美国), HSPA12A 抗体 (Abcam 公司, 美国), ApoA1 抗体、ApoB 抗体、ApoM 抗体 (武汉三鹰生物技术有

限公司),山羊抗兔二抗和抗鼠二抗(Vector Laboratories 公司,美国),甲醛、RIPA(上海碧云天生物技术有限公司),BCA蛋白定量试剂盒、TRIzol(赛默飞世尔科技有限公司,美国),High-sig ECL Western blot底物(上海天能生物科技有限公司),*Apoa1*、*Apob*、*Apom*引物(北京擎科生物科技有限公司)。相关引物序列如下,*Apoa1*上游:5'-GGC-ACGTATG-GCAGCAAGAT-3',下游:5'-CCAAGGAGGAG-GATTCAAAGT-3';*Apob*上游:5'-AAGCA-CCTCC-GAAAGTACGTG-3',下游:5'-CTCCAGCTCTACCT-TACAGTTGA-3';*Apom*上游:5'-TAACTCCATGAAT-CAGTGGCCCT-3',下游:5'-CCCGCAATAAAGTAC-CACAGG-3'。过表达*Hspa12a*的腺病毒及阴性对照(上海吉凯生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

应用GEO数据库,获得盲肠结扎穿孔所致脓毒症小鼠及假手术小鼠肝脏的mRNA标准化表达水平($n=3$),使用GraphPad Prism 8制作直方图,使用R软件制作聚类热图以及火山图。火山图差异基因筛选标准为 $P < 0.01$ 且 $|\log_2FC| > 2$ 。

1.2.2 内毒素血症小鼠模型建立

WT小鼠和*Hspa12a*^{-/-}小鼠分别腹腔注射LPS(5 mg/kg)或生理盐水(normal saline, NS),将小鼠分为NS-WT组、NS-*Hspa12a*^{-/-}组、LPS-WT组和LPS-*Hspa12a*^{-/-}组。注射后6 h进行相应检测和分析。

1.2.3 小鼠体温检测和活动评分

LPS(5 mg/kg)作用0、2、4和6 h后使用直肠探头检测小鼠体温。同时在上述时间段内按照文中所描述的方法进行动物活动评分^[13]。观察小鼠在2 min内的姿势和活动,4分(正常):小鼠没有出现驼背姿势,有自发的快速活动,期间穿插着进食和饮水;3分(轻度):出现偶尔且短暂(5~10 s)的驼背姿势,能够自然恢复正常,并且有自发的快速活动,穿插着进食和饮水;2分(轻中度):出现较长时间(>20 s)的驼背姿势,能够自然恢复正常,并伴有持续自发的快速活动,穿插着进食和饮水;1分(中重度):持续驼背,只有在受到强烈外部刺激时才会活动;0分(重度):持续驼背,不活动。如果小鼠观察期间内出现两种状态,则使用0.5分作为间隔。

1.2.4 血压测量

LPS或NS作用6 h后使用ALC-NIBP无创血压测量仪系统测量小鼠收缩压(systolic blood pressure, SBP)。将传感器套在小鼠尾部,通过充气、放气对

尾动脉加压和释压的同时检测血流信号,得出血压值。

1.2.5 血气分析

LPS或NS作用6 h后,使用1.5%异氟烷麻醉小鼠,插管并通气,使用iSTA T Analyzer MN:300血气分析仪对左心室抽取的动脉血进行血气分析,包括血氧分压(PO₂)、血二氧化碳分压(PCO₂)和血氧饱和度(SO₂)。

1.2.6 小鼠肝功能、血清脂蛋白含量检测

取小鼠血液,1 500 r/min离心15 min取血清;采用全自动生化分析仪检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平。

1.2.7 组织学分析

LPS或NS作用6 h后,取小鼠肝和肠组织用10%福尔马林固定,制备石蜡切片,进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,通过显微镜观察分析结果。每个样本选取6个视野,进行肝和肠组织损伤程度评分及肝组织炎症病灶数量统计。肠组织损伤程度根据Chiu's评分标准^[14]进行评分,具体评分标准如下:肠黏膜、绒毛正常(0分);在绒毛顶端中出现肠黏膜上皮间隙扩大,常伴有毛细血管充血,炎症细胞浸润(1分);肠上皮间隙显著扩张,绒毛顶端上皮与固有层中度分离(2分);固有层大量分离,部分绒毛顶端脱落(3分);绒毛及固有层脱落,毛细血管扩张(4分);固有层破坏,伴出血或溃疡(5分)。肝组织损伤程度根据参考文献所述标准进行评分^[15]:正常肝组织(0分);肝窦充血水肿(1分);肝细胞浆空泡化(2分);肝脏组织点状坏死伴中央静脉炎性细胞浸润(3分);肝脏实质细胞片状坏死(4分)。采用Image J软件对肝组织炎症病灶数量及组织面积进行统计。

1.2.8 原代肝细胞分离提取、培养及处理

使用本课题组先前所描述的方法从6~8周龄WT鼠中分离原代肝细胞^[16]。用Hank's缓冲盐溶液通过门静脉原位灌注肝脏,然后使用0.06%的IV型胶原酶灌注消化肝脏。收集肝脏消化物并以50 g离心3 min,将含有肝细胞的沉淀重悬后铺在有胶原包备的细胞培养板上。肝细胞在含有10%胎牛血清的DMEM中培养16 h后,进行*Hspa12a*或阴性对照(NC)腺病毒转染,24 h后使用LPS(500 ng/mL)或

等量NS作用6 h,收取细胞培养上清进行检测。

1.2.9 蛋白免疫印迹实验

取小鼠30 mg肝组织,加入含有研磨珠和0.3 mL RIPA溶液的研磨管中,放入研磨机充分研磨,冰上裂解30 min,收集总蛋白质,使用BCA法测定蛋白浓度;取等量蛋白质凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h;等渗缓冲盐溶液(TBST)洗涤膜3次,7 min/次,加入一抗4℃孵育过夜;TBST洗涤膜3次,7 min/次;室温加入二抗孵育1 h;TBST洗涤膜3次,7 min/次;将ECL显影剂均匀滴至膜上,并通过ECL发光仪进行显影处理。

1.2.10 RT-PCR

按照先前报道的方法^[10],取60 mg肝组织,使用TRIzol试剂提取组织内的总mRNA,随后逆转录成cDNA。使用SYBR Green Master通过荧光定量PCR检测基因的表达水平。

1.2.11 临床资料收集

纳入南京医科大学第一附属医院2023年12月—2024年3月住院成年患者共30例,其中确诊为脓毒症肝功能损伤的患者15例,未确诊为脓毒症肝功能损伤且年龄和性别相匹配的患者15例作为对照组。通过数字化病案管理系统回顾性查阅患者的临床资料并准确录入其相关临床数据。纳入标准:①符合脓毒症3.0诊断标准^[17],即可疑感染且序贯器官衰竭评分 ≥ 2.0 分;②符合脓毒症肝损伤诊断标准,即至少符合以下1个方面:ALT升高1倍或AST升高1倍。排除标准:①肝脏肿瘤或肝脏部分切除;②中毒、药物损伤等非脓毒症导致的肝损伤;③既往存在慢性肝病如酒精性肝病等;④本次入住ICU因急性肝病或慢性肝病急性发作;⑤胆道疾病,梗阻性黄疸。本研究经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理号:2022-SR2-149)。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;非正态分布的连续性变量采用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]进行描述,两组间比较采用Mann-Whitney检验。定性资料用频数表示,采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS诱导小鼠内毒素血症

采用革兰氏阴性菌细胞壁的主要致病成分LPS

腹腔注射诱导小鼠内毒素血症模型,结果显示LPS(5 mg/kg)作用6 h后小鼠出现活动减弱($P < 0.001$)、体温降低($P < 0.001$)、血SO₂降低($P < 0.01$)、血PO₂降低($P < 0.01$)和SBP降低($P < 0.01$),而血PCO₂增加($P < 0.05$,图1A~F)。组织病理学结果显示,LPS引起了肠和肝的组织损伤评分显著升高(图1G、H)。以上结果表明LPS(5 mg/kg)处理6 h诱导小鼠内毒素血症模型成功。

2.2 HSPA12A在内毒素血症小鼠肝组织中表达降低

课题组前期研究表明HSPA12A可减轻内毒素所致的肺损伤^[11],为了明确HSPA12A是否与内毒素血症所致肝损伤有关,本研究首先采取公共数据库中的GEO数据集(GSE160380),在该RNA测序数据中提取22种热休克蛋白的mRNA表达数据。如图2A所示,与假手术组比较,盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症组小鼠的4个热休克蛋白表达下降、1个表达增加、17个表达不变。其中,*Hspa12a*的mRNA表达显著下降。

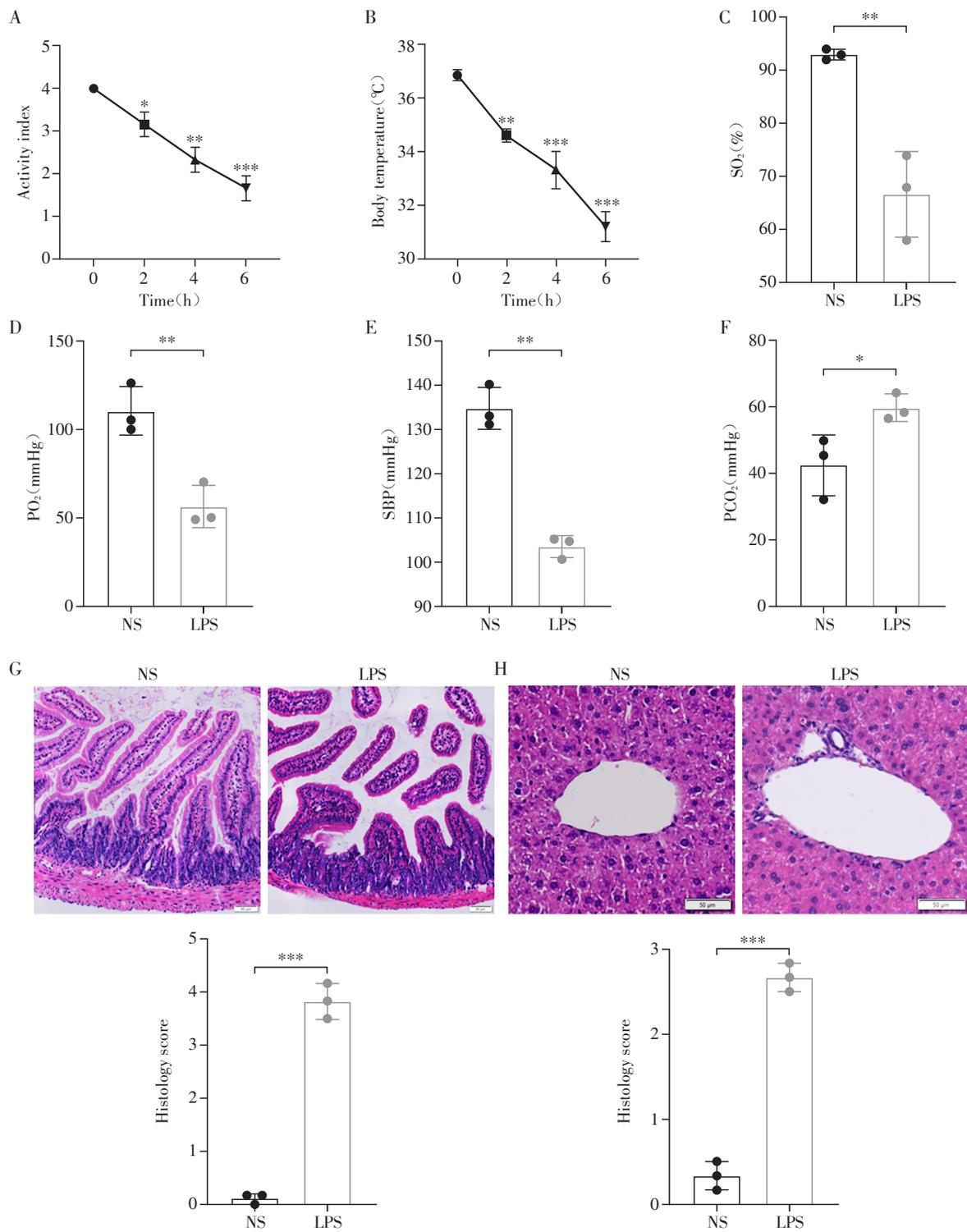
为进一步明确HSPA12A蛋白在内毒素血症肝组织中的表达变化,采用革兰氏阴性菌细胞壁的主要致病成分LPS诱导内毒素血症模型,于LPS作用6 h后收集肝组织进行免疫印迹分析。结果显示,LPS-WT组小鼠肝组织中HSPA12A蛋白水平较NS-WT组显著下降(图2B, $P < 0.05$)。

2.3 *Hspa12a*基因敲除加重内毒素血症肝损伤

为了进一步明确HSPA12A在内毒素血症所致肝损伤中的作用,本研究采用前期构建的*Hspa12a*^{-/-}小鼠,通过免疫印迹分析证实HSPA12A在肝脏中不表达(图3A)。随后采用*Hspa12a*^{-/-}和WT小鼠,分别给予LPS和NS腹腔注射,6 h后采集血清,测定其中肝脏损伤标志物ALT和AST的活性水平。结果如图3B所示,与NS组比较,LPS显著升高WT鼠和*Hspa12a*^{-/-}鼠的ALT($P < 0.05$, $P < 0.001$)和AST($P < 0.01$, $P < 0.001$)水平,而与LPS-WT组比较,LPS-*Hspa12a*^{-/-}组小鼠ALT($P < 0.01$)和AST($P < 0.05$)水平进一步升高。此外,小鼠肝组织HE染色结果显示,LPS使肝组织损伤评分显著升高($P < 0.001$)、炎症病灶数量显著增加($P < 0.001$),而与LPS-WT组比较,LPS-*Hspa12a*^{-/-}组小鼠肝组织损伤评分更高($P < 0.05$),炎症病灶数量更多($P < 0.01$,图3C~E)。

2.4 *Hspa12a*基因敲除降低内毒素血症小鼠肝脏载脂蛋白mRNA表达水平

考虑到脂质代谢在内毒素血症中发挥重要作用^[4],本研究采用公共数据库中的GEO数据集

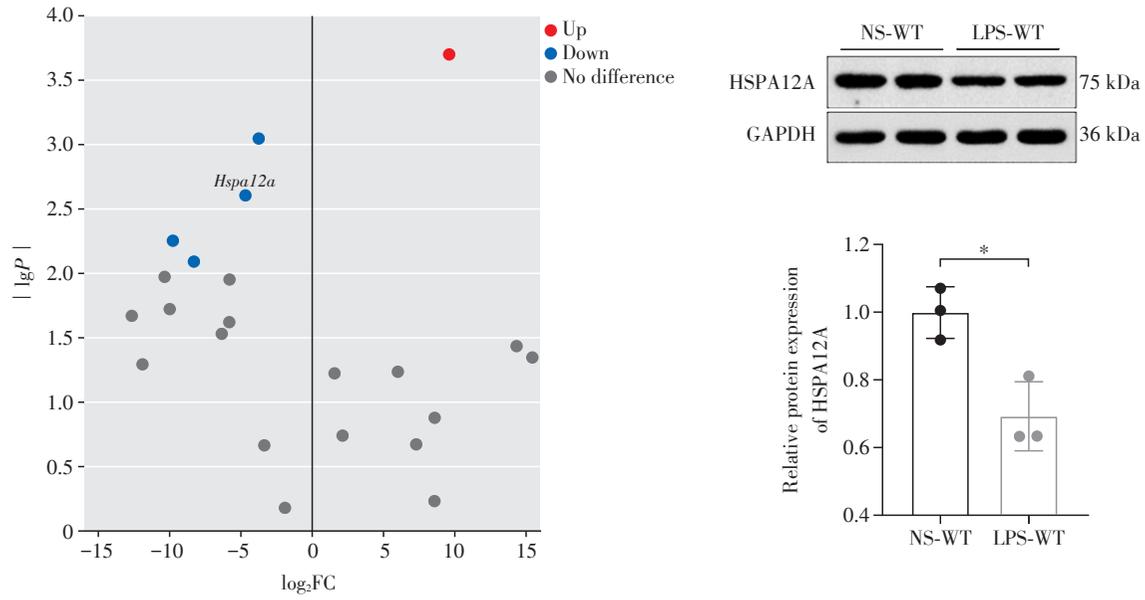


A, B: Activity index(A) and body temperature(B) after LPS treatment in mice. Compared with 0 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$). C-F: Comparison of SO₂(C), PO₂(D), SBP(E), PCO₂(F) between the NS group and the LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$). G, H: HE staining of intestinal tissue(G), hepatic tissue(H), and comparison of histology score between the NS group and the LPS group(Scale bar: 50 μ m). *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图1 LPS诱导小鼠内毒素血症
Figure 1 LPS induced mice endotoxemia

(GSE160830),在该RNA测序数据中提取3种载脂蛋白mRNA的表达数据。如图4A所示,与假手术组小鼠比较,盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症组小鼠肝组

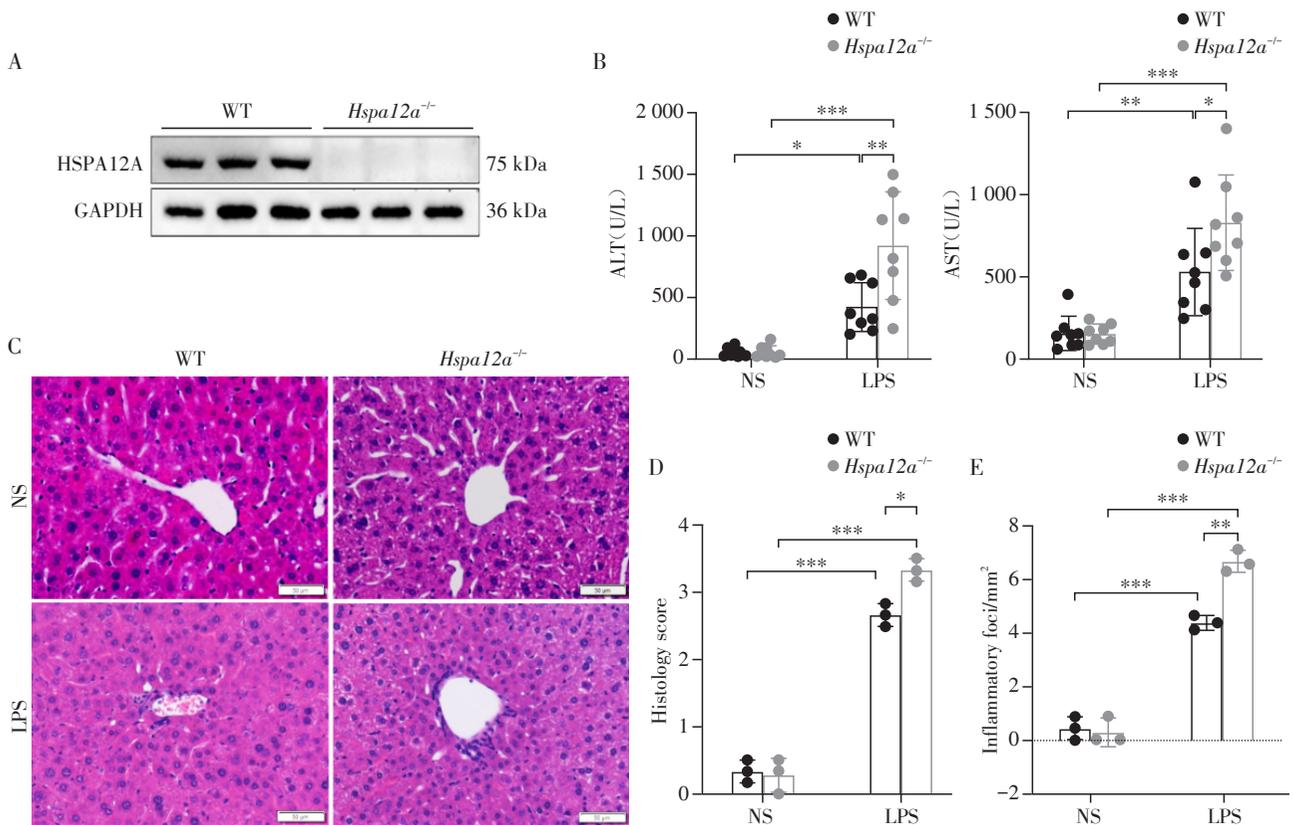
织中的Apoa1、Apob和Apom的mRNA表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$,图4A、B)。这些结果提示,载脂蛋白mRNA水平在脓毒症小鼠肝组织中表



A: Volcano plots showed differentially expressed heat shock protein mRNAs between the CLP group and the sham group. B: Comparison of protein expression levels of HSPA12A in NS and LPS groups, * $P < 0.05$ ($n=3$).

图2 HSPA12A 在内毒素血症小鼠肝组织中表达降低

Figure 2 HSPA12A expression was reduced in livers of endotoxemia mice



A: HSPA12A was not expressed in the liver of *Hspa12a*^{-/-} mice ($n=3$). B: Comparison of ALT and AST level in each group ($n=8$). C: Representative graph of HE staining of hepatic tissue in each group ($n=3$, Scale bar: 50 μm). D: Comparison of histology score in each group ($n=3$). E: Comparison of inflammatory foci/ mm^2 in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

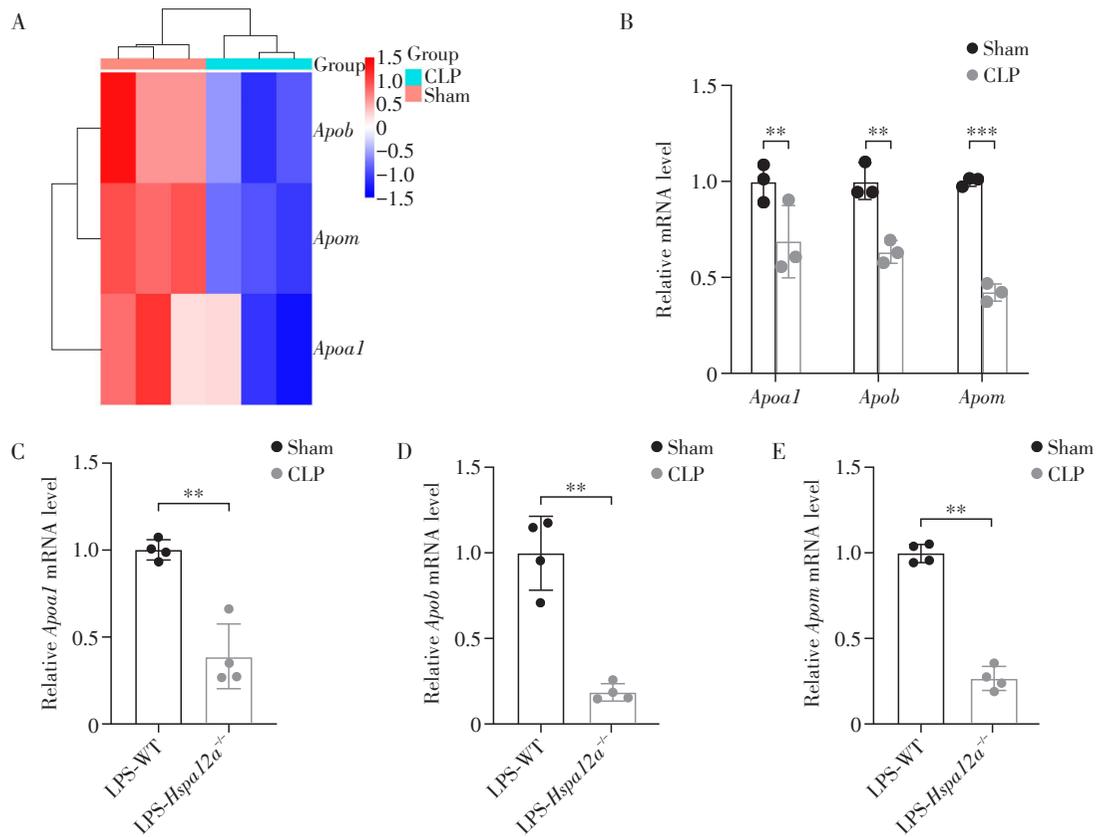
图3 *Hspa12a* 基因敲除加重内毒素血症肝损伤

Figure 3 *Hspa12a* knock-out exacerbated liver injury during endotoxemia

达下降。

为了进一步明确HSPA12A表达下调对内毒素血症肝损伤的加重作用是否与调控载脂蛋白表达有关,本研究通过RT-PCR检测了内毒素血症小鼠肝脏

中*ApoA1*、*ApoB*和*ApoM*的mRNA水平。结果如图4C~E所示,与LPS-WT组小鼠相比,LPS-*Hspa12a*^{-/-}组小鼠肝脏的*ApoA1*($P < 0.01$)、*ApoB*($P < 0.01$)和*ApoM*($P < 0.001$)的mRNA表达水平显著下降。



A: Clustering analysis of *ApoA1*, *ApoB* and *ApoM* in the livers between cecal ligation and puncture (CLP) and sham mice ($n=3$). B: Comparison of *ApoA1*, *ApoB* and *ApoM* mRNA level between CLP and sham mice ($n=3$). C-E: Comparison of hepatic *ApoA1* (C), *ApoB* (D), and *ApoM* (E) mRNA levels in WT and *Hspa12a*^{-/-} mice during endotoxemia. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=4$).

图4 *Hspa12a* 基因敲除降低内毒素血症小鼠肝脏载脂蛋白 mRNA 表达水平

Figure 4 *Hspa12a* knockout reduced apolipoproteins mRNA expression in liver of endotoxemia mice

2.5 *Hspa12a* 基因敲除降低内毒素血症小鼠肝脏载脂蛋白表达水平

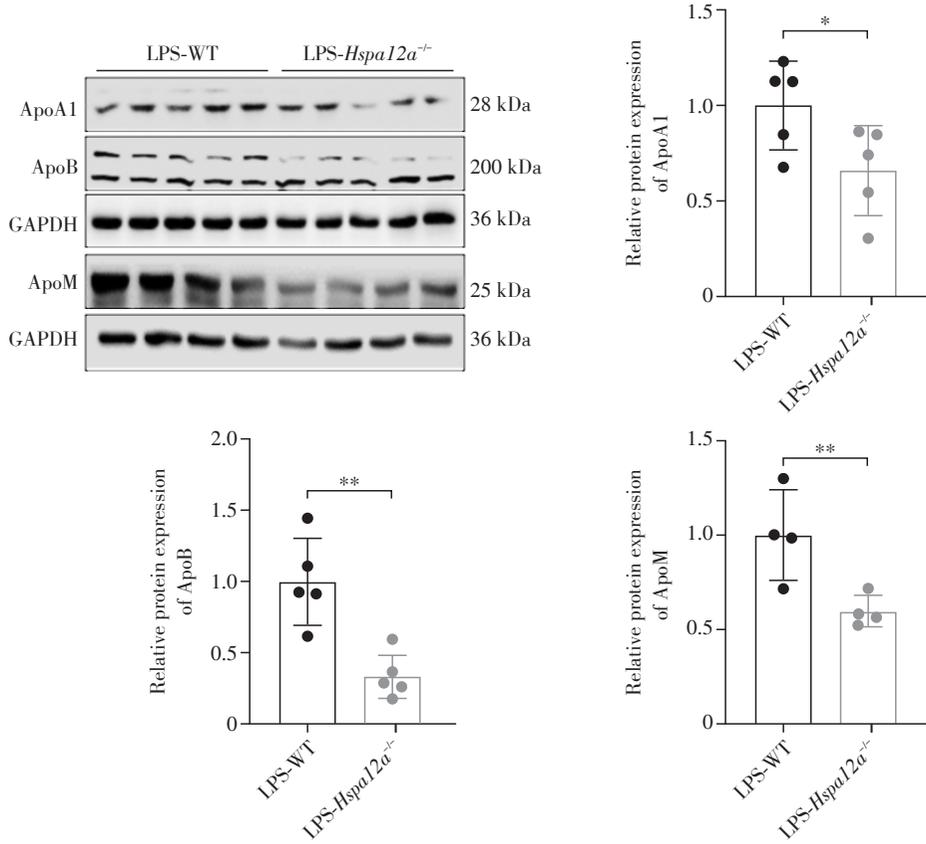
本研究进一步分析了HSPA12A对内毒素血症小鼠肝脏中载脂蛋白表达水平的影响。免疫印迹分析结果如图5所示,与LPS-WT组小鼠相比,LPS-*Hspa12a*^{-/-}组小鼠肝脏中ApoA1($P < 0.05$)、ApoB($P < 0.01$)和ApoM($P < 0.01$)蛋白水平显著下降。

2.6 *Hspa12a* 基因敲除降低内毒素血症小鼠血脂水平

胆固醇下降与内毒素血症不良预后相关^[6],因此本研究检测了血清中胆固醇含量,结果显示,与LPS-WT组相比,LPS-*Hspa12a*^{-/-}组小鼠血清中HDL-C和LDL-C显著下降($P < 0.01$,图6)。

2.7 *Hspa12a* 过表达减轻LPS所致肝细胞损伤

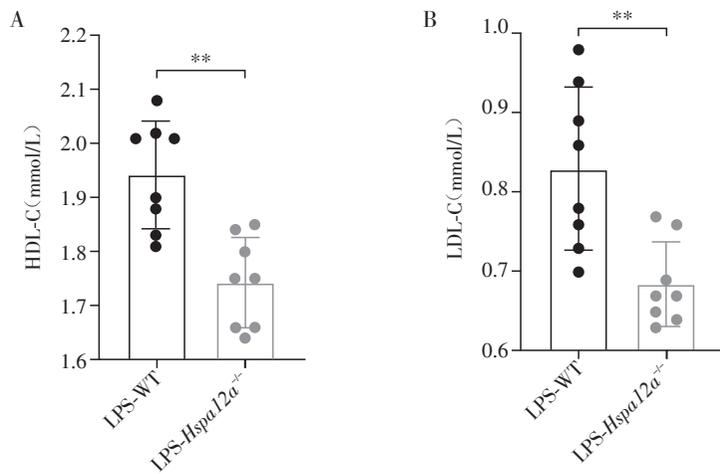
为了明确*Hspa12a*过表达能否改善内毒素血症所致的肝细胞损伤,提取WT小鼠原代肝细胞,采用*Hspa12a*腺病毒感染肝细胞过表达*Hspa12a*(*Hspa12a*^{oe}),而空腺病毒感染的细胞作为阴性对照(NC)。免疫印迹分析证实*Hspa12a*^{oe}组相比NC组HSPA12A表达增高(图7A)。采用LPS(500 ng/mL)或等量NS作用于原代肝细胞,6 h后收取细胞培养上清测定其中肝细胞损伤标志物ALT和AST的活性水平,结果如图7B、C所示,与NS组比较,LPS显著升高了*Hspa12a*^{oe}组和NC组肝细胞培养上清中的ALT($P < 0.001$)和AST($P < 0.01$, $P < 0.001$)水平,同时LPS处理后,*Hspa12a*^{oe}组较NC组的ALT和AST水平上升幅度降低($P < 0.01$)。



Comparison of protein expression level of hepatic ApoA1 (n=5), ApoB (n=5) and ApoM (n=4) between WT and *Hspa12a*^{-/-} mice during endotoxemia. *P < 0.05, **P < 0.01.

图5 *Hspa12a* 基因敲除降低内毒素血症小鼠肝脏载脂蛋白表达水平

Figure 5 *Hspa12a* knockout reduced apolipoprotein protein expression in liver of endotoxemia mice



Comparison of HDL-C(A) and LDL-C(B) level in serum of WT and *Hspa12a*^{-/-} mice during endotoxemia, **P < 0.01 (n=8).

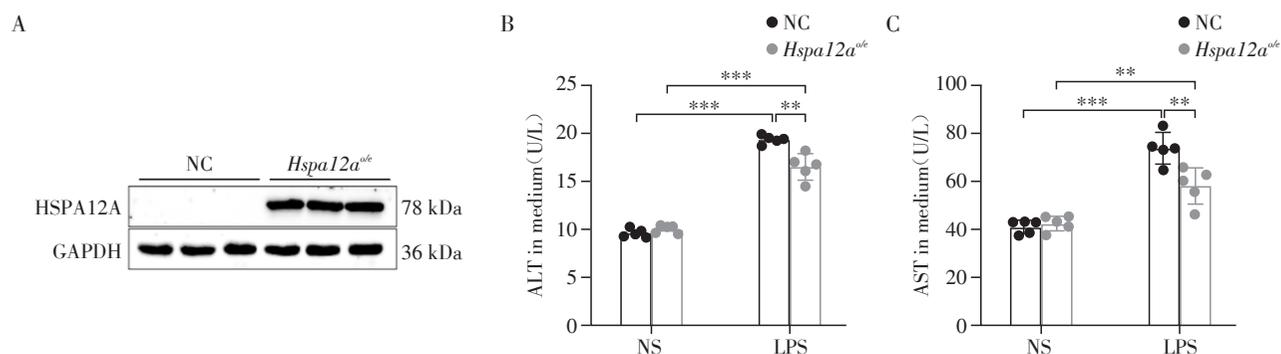
图6 *Hspa12a* 基因敲除降低内毒素血症小鼠血脂水平

Figure 6 *Hspa12a* knockout reduced blood lipid level in endotoxemia mice

2.8 脓毒症患者血浆脂蛋白胆固醇降低

通过分析GEO数据集,发现CLP所致脓毒症小鼠肝组织中的 *ApoA1*、*ApoB* 和 *ApoM* 的 mRNA 表达水平相较于假手术组显著降低。本课题组的小

鼠模型发现 *Hspa12a* 基因敲除进一步降低内毒素血症小鼠载脂蛋白 ApoA1、ApoB 和 ApoM 表达水平的同时,小鼠肝功能损伤加剧。载脂蛋白是脂蛋白的重要结构成分,其中 ApoA1 和 ApoM 主要参



A: HSPA12A expression was increased in hepatocytes of *Hspa12a^{oe}* group. B, C: Comparison of ALT(B) and AST(C) level in medium of each group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=5$).

图7 *Hspa12a* 过表达减轻LPS所致的肝细胞损伤

Figure 7 *Hspa12a* overexpression alleviated LPS induced hepatic injury

与构成HDL, ApoB主要参与构成LDL, HDL及LDL与血浆中胆固醇结合形成HDL-C和LDL-C。因此本研究分析了内毒素血症小鼠血清中HDL-C和LDL-C的水平,发现*Hspa12a*基因敲除显著降低了内毒素血症小鼠血清中HDL-C和LDL-C水平,提示血浆脂蛋白胆固醇降低可能与内毒素血症所致肝损伤有关。进一步回顾性分析2023年12月—2024年3月在南京医科大学附属第一医院住院的15例临床诊断为脓毒症肝功能损伤的成年患者,并以15例年龄性别相匹配的非脓毒症成年患者为对照组。

通过数字化病案系统查询录入其相关临床数据,包括性别、年龄以及血浆中ALT、AST、HDL-C和LDL-C的表达水平。卡方检验显示,两组间性别差异无统计学意义($P=0.705$),Mann-Whitney检验显示两组间年龄差异无统计学意义($P=0.327$),脓毒症肝损伤患者血浆中ALT和AST表达水平相比对照组显著上升($P < 0.001$),而血浆中的HDL-C水平显著下降。独立样本 t 检验显示,与对照组相比,脓毒症肝损伤组LDL-C水平显著下降($P < 0.001$,表1)。

表1 两组间临床数据的比较

Table 1 Comparison of clinical data between two groups

Variable	Control($n=15$)	Sepsis with liver injury($n=15$)	P
Sex[$n(\%)$]			0.705
Male	9(60.00)	10(66.67)	
Female	6(40.00)	5(33.33)	
Age[years, $M(P_{25}, P_{75})$]	68.93(62.00, 75.00)	73.80(60.00, 92.00)	0.327
ALT[U/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	15.40(11.40, 18.70)	84.60(43.10, 143.40)	< 0.001
AST[U/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	21.60(19.00, 28.90)	93.00(74.90, 174.10)	< 0.001
HDL-C[mmol/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	1.280(1.000, 1.520)	0.520(0.490, 0.630)	< 0.001
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.919 ± 0.847	1.671 ± 0.766	< 0.001

3 讨论

本研究发现,内毒素血症小鼠肝脏中HSPA12A表达水平降低,而*Hspa12a*基因敲除加重了内毒素血症所致肝损伤。机制上,*Hspa12a*基因敲除在内毒素血症期间进一步降低了载脂蛋白ApoA1、ApoB和ApoM的表达水平,同时表现出更低的HDL-C和LDL-C水平。进一步体外细胞实验发现,过表达*Hspa12a*能够改善内毒素血症所致肝损伤。这提示

HSPA12A参与内毒素血症肝损伤的保护,该作用可能与维持肝脏载脂蛋白及脂蛋白稳态有关。

热休克蛋白是一类在进化上高度保守的蛋白伴侣超家族,除了发挥分子伴侣作用外,多种热休克蛋白还参与维持包括肝脏在内的多种脏器的功能稳态^[18-20]。但作为热休克蛋白70家族的新成员,HSPA12A的生物学功能尚未完全阐明。本研究发现,内毒素血症小鼠在血清ALT和AST水平显著升高的同时,肝脏HSPA12A表达水平降低,提示

HSPA12A可能参与了内毒素血症肝损伤的发生发展。进一步研究发现,*Hspa12a*基因敲除显著加重内毒素血症小鼠的肝功能损害,提示内毒素血症诱导肝脏HSPA12A表达下调,而HSPA12A表达下调则推动了内毒素血症肝损伤的发生发展。

以往研究表明,脂质代谢紊乱是造成脓毒症肝损伤的重要原因之一^[21]。脓毒症患者血浆中ApoM浓度降低且与急性期标志物呈负相关,严重脓毒症患者中ApoM下降幅度更大且ApoA1以及ApoB的含量显著下降^[22-23]。一项孟德尔随机化分析也表明ApoA1对脓毒症具有保护作用^[24]。此外,基于GEO数据集分析也发现脓毒症使*Apoa1*、*Apob*和*Apom*的mRNA表达水平降低,提示载脂蛋白异常可能是导致脓毒症小鼠肝功能下降的原因。为此,本研究分析了在内毒素血症中HSPA12A对ApoA1、ApoB和ApoM等载脂蛋白表达的影响。结果显示,*Hspa12a*基因敲除进一步降低了ApoA1、ApoB和ApoM的表达水平,表明HSPA12A在内毒素血症期间影响了肝脏载脂蛋白的合成,从而发挥肝脏保护的功能。胆固醇是一种甾醇脂质,研究表明脓毒症期间HDL-C^[25]、LDL-C^[26]浓度下降程度与患者预后相关^[7,27]。肝脏是脂蛋白代谢的重要器官,参与合成载脂蛋白ApoA1以及ApoM结合并运输HDL-C,同时参与合成ApoB结合并运输LDL-C^[28-29]。脓毒症伴肝功能不全者HDL-C水平通常较低,输注HDL模拟物可减轻肝损伤^[30]。同时也有研究表明腹腔注射LDL可减轻LPS所致的肝脏炎症^[31]。本研究结果显示,在内毒素血症中敲除*Hspa12a*基因使小鼠血清中HDL-C和LDL-C水平降低。为了明确HSPA12A是否参与内毒素血症肝损伤的保护作用,本研究通过细胞实验过表达*Hspa12a*,采用LPS作用于细胞模拟内毒素血症肝损伤模型,结果发现*Hspa12a*过表达减轻了LPS引起肝细胞血清中ALT和AST水平的升高,表明*Hspa12a*过表达保护了内毒素血症肝损伤。这些结果提示*Hspa12a*基因敲除导致更严重的肝损伤,可能与载脂蛋白和脂蛋白的失调有关。而*Hspa12a*过表达保护内毒素血症肝损伤,推测可能与维持载脂蛋白和脂蛋白的稳态有关。另一方面,本课题组回顾性查阅提取了临床样本数据进行分析,发现脓毒症并发肝功能损伤的患者血浆中ALT和AST水平相比非脓毒症患者显著升高,而HDL-C和LDL-C水平显著降低,进一步提示脓毒症导致肝功能损伤可能与患者血浆脂蛋白的下降有关。

综上所述,本研究发现HSPA12A表达下调介导

了内毒素血症肝损伤,该作用可能与抑制肝脏载脂蛋白表达、降低血液HDL-C和LDL-C有关。而提高HSPA12A表达水平可保护内毒素血症所致的肝损伤,可能是通过维持载脂蛋白和脂蛋白稳态介导,为临床上相关治疗提供了潜在的新靶点。然而,HSPA12A在内毒素血症所致肝损伤中的具体作用机制还有待进一步深入探究。

[参考文献]

- [1] CHIU C, LEGRAND M. Epidemiology of sepsis and septic shock[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2021, 34(2): 71-76
- [2] HUANG M, CAI S, SU J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5376
- [3] CARABALLO C, JAIMES F. Organ dysfunction in sepsis: an ominous trajectory from infection to death[J]. *Yale J Biol Med*, 2019, 92(4): 629-640
- [4] MUNIZ-SANTOS R, LUCIERI-COSTA G, DE ALMEIDA M A P, et al. Lipid oxidation dysregulation: an emerging player in the pathophysiology of sepsis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1224335
- [5] 程靖, 张宝, 管石侠, 等. 重症监护室患者血脂与血清内毒素及炎症因子水平的关系[J]. *内科急危重症杂志*, 2021, 27(2): 131-134
- [6] HOFMAENNER D A, KLEYMAN A, PRESS A, et al. The many roles of cholesterol in sepsis: a review[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(4): 388-396
- [7] 于凡, 韩双剑, 张宁, 等. 脓毒症患者高密度脂蛋白胆固醇水平的变化及其对患者预后的影响[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2020, 19(11): 822-827
- [8] 马娣, 王飞, 朱洪超, 等. 血脂水平与脓毒症患者预后的相关性研究[J]. *中国医刊*, 2015, 50(4): 94-96
- [9] MAO Y, KONG Q, LI R, et al. Heat shock protein A12A encodes a novel prosurvival pathway during ischaemic stroke[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5 Pt A): 1862-1872
- [10] DU S, ZHANG X S, JIA Y, et al. Hepatocyte HSPA12A inhibits macrophage chemotaxis and activation to attenuate liver ischemia/reperfusion injury via suppressing glycolysis-mediated HMGB1 lactylation and secretion of hepatocytes[J]. *Theranostics*, 2023, 13(11): 3856-3871
- [11] DAI Y, LIU J, ZHANG X, et al. HSPA12A improves endothelial integrity to attenuate lung injury during endotoxemia through activating ERKs and Akt-dependent signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107987
- [12] ZHANG X J, CHEN X, QI T, et al. HSPA12A is required for adipocyte differentiation and diet-induced obesity through a positive feedback regulation with PPAR γ [J].

- Cell Death Differ, 2019, 26(11): 2253-2267
- [13] WALLEY K R, THAIN K R, RUSSELL J A, et al. PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(258): 258ra143
- [14] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483
- [15] JIA L, ZHANG M H. Comparison of probiotics and lactulose in the treatment of minimal hepatic encephalopathy in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(6): 908-911
- [16] KONG Q, LI N, CHENG H, et al. HSPA12A is a novel player in nonalcoholic steatohepatitis via promoting nuclear PKM2-mediated M1 macrophage polarization [J]. *Diabetes*, 2019, 68(2): 361-376
- [17] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810
- [18] SHI W, CHEN J, ZHAO N, et al. Targeting heat shock protein 47 alleviated doxorubicin-induced cardiotoxicity and remodeling in mice through suppression of the NLRP3 inflammasome[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2023, 186: 81-93
- [19] SCHLEEF M, ROZES M, PILLOT B, et al. Heat shock protein 70 is involved in the efficiency of preconditioning with cyclosporine a in renal ischemia reperfusion injury by modulating mitochondrial functions[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9541
- [20] REHATI A, ABUDUAINI B, LIANG Z, et al. Identification of heat shock protein family A member 5 (HSPA5) targets involved in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Genes Immun*, 2023, 24(3): 124-129
- [21] VAN WYNGENE L, VANDERHAEGHEN T, TIMMERMANS S, et al. Hepatic PPAR α function and lipid metabolic pathways are dysregulated in polymicrobial sepsis[J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(2): e11319
- [22] KUMARASWAMY S B, LINDER A, ÅKESSON P, et al. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes[J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): R60
- [23] 陈 谦, 蒋文强. 脓毒症患者糖脂代谢紊乱与免疫功能和病情及预后的相关性分析[J]. *中国医药*, 2023, 18(1): 71-76
- [24] LOU C, MENG Z, SHI Y Y, et al. Genetic association of lipids and lipid-lowering drugs with sepsis: a Mendelian randomization and mediation analysis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1217922
- [25] TANAKA S, COURET D, TRAN-DINH A, et al. High-density lipoproteins during sepsis: from bench to bedside[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 134
- [26] WALLEY K R, BOYD J H, KONG H J, et al. Low low-density lipoprotein levels are associated with, but do not causally contribute to, increased mortality in sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(3): 463-466
- [27] 刘金涛, 王绍红. 血脂变化对ICU脓毒症患者预后的研究[J]. *中国医药指南*, 2015, 13(21): 131-132
- [28] HEEREN J, SCHEJA L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism[J]. *Mol Metab*, 2021, 50: 101238
- [29] LUO G, XU N. Apolipoprotein m: research progress and clinical perspective [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1276: 85-103
- [30] STASI A, FIORENTINO M, FRANZIN R, et al. Beneficial effects of recombinant CER-001 high-density lipoprotein infusion in sepsis: results from a bench to bedside translational research project [J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 392
- [31] RADFORD-SMITH D E, YATES A G, RIZVI L, et al. HDL and LDL have distinct, opposing effects on LPS-induced brain inflammation[J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 54

[收稿日期] 2023-12-21

(本文编辑: 蒋 莉)