



热休克因子1通过上调蛋白质C减轻 脓毒症凝血功能障碍保护小鼠急性肺损伤*

王浩^{1,2,3)} 李涛⁴⁾ 肖归⁵⁾ 刘梅冬^{1,2,3)} 刘可^{1,2,3)}张华莉^{1,2,3)} 朱雅茜^{1,2,3)**} 肖献忠^{1,2,3)**}⁽¹⁾ 中南大学基础医学院病理生理学系, 长沙 410008; ⁽²⁾ 脓毒症转化医学湖南省重点实验室, 长沙 410008;⁽³⁾ 医学机能学国家级实验教学中心, 长沙 410078; ⁽⁴⁾ 嘉应学院医学院病理生理学教研室, 梅州 514031;⁽⁵⁾ 中南大学湘雅护理学院, 长沙 410008)

摘要 **目的** 探讨热休克因子1 (HSF1) 减轻脓毒症凝血功能障碍, 保护小鼠急性肺损伤的机制。**方法** 本研究采用盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 制备脓毒症小鼠模型, 检测凝血相关指标和观察小鼠肺部病理变化, 通过酶联免疫吸附实验 (ELISA)、qRT-PCR 和蛋白质印迹法 (Western blot) 等方法检测蛋白质C表达水平, 通过质粒转染抑制或增强 HSF1 表达从而观察蛋白质C表达水平的变化, 并利用生物信息学、凝胶电泳迁移实验 (EMSA) 和双荧光素酶报告基因实验探讨 HSF1 调节蛋白质C转录的机制。**结果** 在 CLP 脓毒症小鼠模型中, HSF1^{-/-}小鼠的凝血活性与 HSF1^{+/+}组相比明显增强, 肺损伤明显加重。ELISA、qRT-PCR 和 Western blot 检测发现, HSF1^{-/-}脓毒症小鼠血浆和肺组织中的蛋白质C表达水平显著低于野生型小鼠。体外 bEnd.3 血管内皮细胞的实验结果显示, HSF1 抑制脂多糖 (LPS) 诱导的蛋白质C表达, HSF1 过表达则增强蛋白质C表达。生物信息学数据分析提示, 蛋白质C启动子区含有 HSF1 结合元件 (HSE), 通过 EMSA 和双荧光素酶报告基因实验显示 HSF1 与蛋白质C启动子区域 HSE 结合, 从而上调蛋白质C转录。**结论** 本研究揭示了 HSF1 参与小鼠脓毒症急性肺损伤的发生, 并通过上调蛋白质C转录, 减轻脓毒症凝血功能障碍, 从而对小鼠肺组织起到保护作用。

关键词 热休克因子1, 脓毒症, 蛋白质C, 凝血, 急性肺损伤**中图分类号** R363, R563**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0091

脓毒症 (sepsis) 是宿主在严重感染等因素作用下, 免疫反应失调引起器官功能障碍的一种威胁生命的临床综合征^[1-3], 是各种严重创伤、烧伤、感染以及大手术后常见的并发症, 其病情进展迅速, 病死率高, 给临床救治带来许多挑战^[4]。据统计, 全球每年住院的严重脓毒症病例数接近1 900万, 每年有多达500万人死于脓毒症^[5-6], 是当前危害人类健康的重要问题。脓毒症发病机制复杂, 当脓毒症发生时, 病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 和损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 作用多个系统, 导致各种细胞内信号转导通路的激活和多种基因表达调控的改变, 引起复杂的病理生理改变和多种组织器官损伤^[7]。

凝血功能的紊乱是脓毒症发生发展过程中重要的病理生理变化之一。当凝血系统被激活, 触发凝血级联反应, 产生大量微血栓甚至弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 的形成, 最终导致多器官功能衰竭, 是患者死亡的重要原因^[8-9]。抗凝治疗可一定程度改善凝血功能紊乱, 提高患者脓毒症 DIC 患者的生存率^[10]。研究脓毒症凝血功能紊乱的发生机制, 找到新的药物干预靶标, 对提高患者的生存率具有重要意义。

* 国家自然科学基金 (81871610, 82172146, 82000742) 资助项目。

**通讯联系人。

肖献忠 Tel: 0731-82355020, E-mail: xiaoxianzhong@csu.edu.cn

朱雅茜 Tel: 0731-82355020, Email: zhu_yaxi@csu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-15, 接受日期: 2022-03-23

热休克因子1 (heat shock factor 1, HSF1) 是机体内一种重要的转录因子, 在应激和炎症反应等病理过程中起到了重要的调控作用。课题组的前期研究显示, HSF1 对小鼠内毒素血症具有明显的保护作用, HSF1 通过上调热休克蛋白70的表达, 抑制内毒素所致晚期炎症介质高迁移率族蛋白1的释放, 减轻全身炎症反应^[11-12], 也可以通过直接调控粒细胞集落刺激因子、白介素-10等多种炎症因子的表达^[13-15], 减轻内毒素血症小鼠的多器官损伤。HSF1 作为脓毒症发生发展过程中重要的保护因子, 对脓毒症凝血功能紊乱起到调控作用目前报道较少。因此, 本研究旨在探讨 HSF1 是否通过改善脓毒症小鼠的凝血活性从而对小鼠的肺组织起到一定的保护作用, 以期揭示 HSF1 在脓毒症凝血功能障碍中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验小鼠为 HSF1 基因敲除 (HSF1^{-/-}) 和野生型 (HSF1^{+/+}) 小鼠, 由美国密尔沃基威斯康星州医学院 Ivor J Benjamin 教授惠赠^[16], 中南大学湘雅医学院实验动物中心负责饲养, SPF 级, 经过小鼠基因型鉴定、筛选及配种繁殖, 获取合格的 HSF1^{-/-} 和 HSF1^{+/+} 小鼠, 性别和年龄同等匹配, 雌雄各半, 年龄 8~12 周, 体重 20~25 g。动物实验得到中南大学实验动物伦理委员会的批准。

1.2 小鼠行盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 构建小鼠脓毒症模型

小鼠 CLP 实验模型建立参考文献方法进行^[17-18]。具体步骤如下: 取 HSF1^{-/-} 和 HSF1^{+/+} 小鼠, 首先用 2% 异氟烷麻醉小鼠。充分暴露小鼠腹部, 沿腹中线垂直剪开腹部皮肤和肌层约 0.5~1 cm, 于左下腹腹腔中取出盲肠后, 在靠近盲肠末端中外 1/3 处穿线结扎, 取 21 号针在外 1/3 处给予盲肠对穿孔, 并用镊子轻轻挤出少许粪便以保证穿孔处通畅, 关闭腹腔, 术后皮下注射 1 ml 温热生理盐水液体复苏。实验结束, 观察小鼠的变化以判断脓毒症模型建模成功。

1.3 血液样本采集和处理

心脏穿刺法采血。在穿刺前, 在注射器中加入抗凝剂 (3.8% 柠檬酸钠, 1:9), 提取血液并上下颠倒充分混合。血液样本立即在 4℃, 1 000 g, 离心 15 min。血浆样本立即用于凝血指标分析。剩余的血浆样品在 -80℃ 下冷冻, 用于后续实验。

1.4 小鼠肺组织病理学观察

小鼠脱颈处死, 迅速提取部分肺组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 经脱水、透明、透蜡和石蜡包埋后切成 3~5 μm 厚度的薄片, 切片再使用二甲苯脱蜡后, 各级浓度的乙醇水化及蒸馏水冲洗, 苏木精 (hematoxylin, H) 及伊红 (eosin, E) 水溶液中染色 5~15 min, 常规清洗、酒精脱水, 二甲苯透明后中性树胶封片。HE 染色后的组织切片置于光学显微镜下观察组织形态学的变化并进行病理学评分以判断组织损伤程度。

1.5 肺组织湿/干重比 (wet/dry ratio, W/D) 检测

采用肺组织湿/干重比检测来评估小鼠肺水肿的程度。小鼠在 CLP 后不同时间点脱颈处死, 开胸摘除一侧肺组织并称重 (湿重)。肺组织在 80℃ 下加热 24 h, 以获得干重并计算 W/D 比值。

1.6 组织免疫荧光染色

在不同时间点处死 CLP 模型小鼠。立即取出左肺, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h。石蜡包埋后, 将组织切成 4 μm 的切片。经抗原修复后, 加 5% 山羊血清封闭液, 室温放置 20 min。随后, 加入抗纤维蛋白/纤维蛋白原一抗 (1:200, Abcam), 4℃ 下避光孵育过夜。加入 FITC 山羊抗兔 IgG (1:250, Abclonal) 的荧光二抗, 37℃ 避光孵育 1~1.5 h。加抗荧光衰减封片液封片。荧光显微镜 (全景 MIDI 全景 250, 匈牙利) 进行图像采集。

1.7 qRT-PCR

使用 TRIzol® 试剂 (Invitrogen Thermo Fisher, 美国) 提取肺组织或细胞中的总 RNA, 经 PrimeScript 逆转录酶 (TaKaRa, 日本) 和随机引物逆转录成 cDNA。采用 Applied Biosystems 7500 PCR 仪器进行 PCR 反应。反应条件为: 预变性 95℃ 30 s; 变性 95℃ 5 s; 退火延伸 60℃ 34 s; 40 个循环。在 60℃ 设置荧光检测点。qRT-PCR 的引物序列为: 蛋白质 C (Pro C) 上游引物, 5'-ATCTGTGACTTCGAGGAGGC-3', 下游引物, 5'-ATTGTTACCCGACAGTCCT-3'; β-actin 上游引物, 5'-CATTGCTGAC AGGATGCAGAAGG-3', 下游引物, 5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'。以 2^{-ΔΔCt} 表示每个样本 mRNA 的相对表达量。

1.8 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

小鼠心脏采血后, 立即 4℃, 1 000 g, 离心 15 min, 收集上清即血浆于新的灭菌 EP 管中用于 BCA 蛋白定量和活化蛋白质 C (APC) (CSB-E09914m, 湖北武汉) 的含量检测。方法按照厂家

提供的标准操作进行。

1.9 蛋白质印迹法 (Western blot)

从肺组织或细胞中分离的蛋白质样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到 PVDF 膜后, 5% 牛奶封闭液中 (TBST 配制) 封闭 2 h, 加入蛋白质 C (1:1 000, GeneTex) 和 β -actin (1:2 500, Cell Signalling Technology) 抗体, 4°C 孵育过夜。加入用 5% BSA 配制的相应二抗, 室温摇床孵育 1.5 h。TBST 洗膜 3 次后进行化学发光法显色, 结果采用 ImageJ 软件对图像进行定量分析。

1.10 质粒构建及提取

组成活化型 HSF1 质粒 pcDNA3.1(+)/HSF1(+) (mHSF1) 和空载体质粒 pcDNA3.1(+)/HSF1-wt 由瑞士 Pharmaceuticals S.A. 的 Richard Voellmy 博士提供。蛋白质 C 全长质粒 pGL3-ProC-wt (ProC-wt, -621~-1 bp) 和突变质粒 pGL3-ProC-mut (HSE1-mut, -584~-577 bp 突变) 的构建由上海生物工程有限公司完成, 通过测序结果验证了合成序列的真实性。质粒提取 (D6950-01, Omega) 根据厂家说明书进行, 提取后的质粒 -20°C 下存储, 用于后续实验。

1.11 细胞核蛋白的提取

bEnd.3 细胞在细胞培养皿中 43°C 热处理 60 min^[19]。细胞核蛋白提取 (20126ES50, Yeasen) 按以下步骤进行: 细胞收集于离心管中, 在细胞沉淀中按每 20 μ l 加入含 PMSF 的试剂 A 200 μ l。最高速剧烈涡旋 5 s, 完全悬浮分散细胞沉淀, 冰浴 10~15 min。加入胞浆蛋白抽提试剂 B (试剂 B) 10 μ l, 最高速剧烈涡旋 5 s, 冰浴 1 min。最高速剧烈震荡涡旋 5 s, 4°C 离心, 12 000~16 000 g, 5 min。去除上清, 加入含 PMSF 的试剂 C 50 μ l。最高速剧烈涡旋 15~30 s, 完全悬浮分散沉淀, 置于冰中, 每隔 1~2 min 再高速剧烈涡旋 15~30 s, 共持续 30 min。然后, 4°C, 12 000~16 000 g 离心 10 min。立即吸取上清 (细胞核蛋白) 至另一预冷的离心管中。BCA 法检测蛋白质浓度后立即使用或 -80°C 冻存备用。

1.12 细胞培养和转染

bEnd.3 细胞在含 10% 的胎牛血清 (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) 的高糖 DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) 培养基中进行培养。细胞铺板后, 待生长密度控制在 70%~80% 进行细胞转染, 使用 Lipofectamine®3000 Reagent (L3000015, Invitrogen) 进行质粒细胞转染。

1.13 凝胶电泳迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

根据蛋白质 C 启动子区的 HSE^[20-21] 序列进行设计并由上海生物工程技术公司合成寡核苷酸探针 (包括标记探针、竞争探针和突变探针) (表 1)。蛋白质 C 寡核苷酸探针 (显示为单链) 如下: 5'-ctggctcctgagctgaGAAGTTTCagacaacagcattt-3'。EMSA 使用 EMSA 试剂盒 (20148, Thermo Fisher Scientific) 操作, 方法参照文献进行^[22]。用链霉亲和素-辣根过氧化物酶结合物和化学发光底物检测生物素标记的 DNA。超迁移实验加用抗 HSF1 抗体 (ab2923, Abcam) 2 μ l 加入到反应体系中。

Table 1 Pro C probe sequence

Probe	Probe Sequences (5'-3')
Labeled probe F	Biotin-ctggctcctgagctgagaagtttcagacaacagcattt
Labeled probe R	Biotin-aaatgctgtgtgtctgaaacttctcagctcaggaccag
Competitive probe F	ctggctcctgagctgagaagtttcagacaacagcattt
Competitive probe R	aaatgctgtgtgtctgaaacttctcagctcaggaccag
Mutant probe F	ctgatcctgagctgagcagtgctcagacaatagcagtt
Mutant probe R	aactgctattgtctgacactgctcagctcaggatcag

1.14 双荧光素酶报告基因实验

bEnd.3 细胞培养并铺 24 孔板, 用 500 ng 蛋白质 C 报告基因质粒、500 ng mHSF1 质粒或空载体质粒 pcDNA3.1 和 20 ng 内参质粒 pRL-TK 共转染 (L3000015, Invitrogen) 48 h。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (E1910, Promega) 进行操作, 并使用 SynergyHI 荧光酶标仪 (BioTek) 分析检测。数据以萤火虫荧光量与海肾荧光量的比值表示。

1.15 统计学分析

收集并整理数据, 使用 SPSS21.0 和 GraphPad Prism7.0 进行统计学分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示。两两比较采用 *t* 检验, 多组比较采用 ANOVA 单因素方差分析, 然后采用 Bonferroni 事后检验 (Bonferroni post hoc test)。以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 HSF1减轻脓毒症小鼠的急性肺损伤

首先采用 CLP 构建小鼠脓毒症模型, 在不同的时间点观察 CLP 后小鼠肺组织病理形态学变化。HE 染色结果表明, CLP 后, 小鼠的肺组织出现了

不同程度的损伤, 如肺脏血管充血、肺泡腔及肺间质水肿、肺泡隔增厚、中性粒细胞浸润等; 通过半定量分析评估^[23]脓毒症小鼠的肺组织损伤程度, 显示肺组织损伤随着时间的推移而逐渐增加 (图

1a, b), 而且, 脓毒症小鼠肺组织湿/干比增大 (图1c)。与 HSF1^{+/+}组相比, HSF1^{-/-}组小鼠的肺损伤表现更明显 (图1a-c)。结果表明, HSF1对脓毒症所致肺组织损伤起到保护作用。

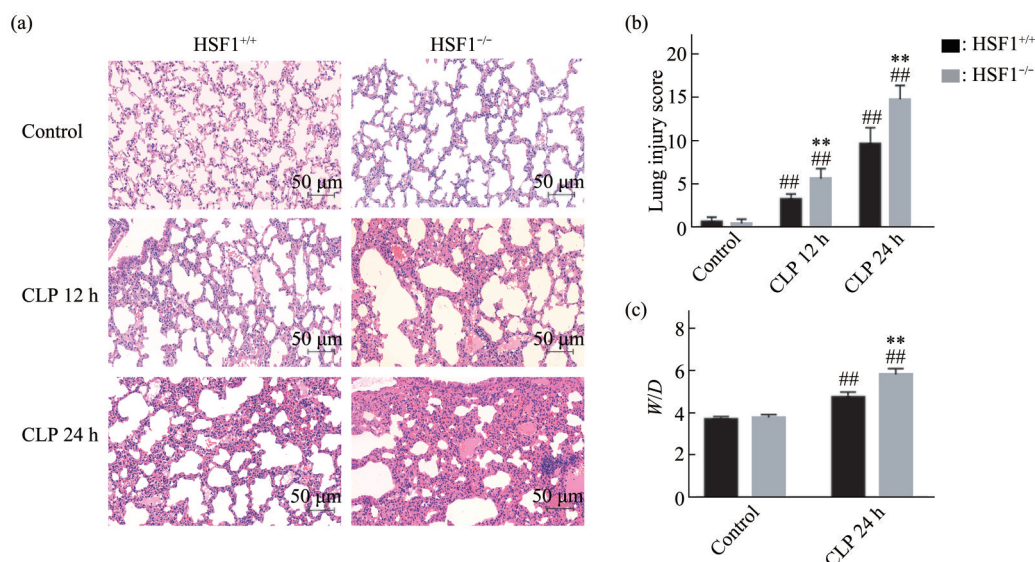


Fig. 1 Effects of HSF1 on the morphological changes in lung tissue of mice with sepsis

(a) HE staining detected morphological changes in the lungs of septic mice; (b) lung tissue damage score; (c) lung tissue wet/dry ratio. ## $P < 0.01$, vs HSF1^{+/+} control; ** $P < 0.01$, vs HSF1^{+/+} CLP; $n = 6$.

2.2 HSF1改善脓毒症小鼠的凝血紊乱以及减少肺微血栓的形成

凝血功能的异常是脓毒症的一个重要的病理生理学变化, 为了了解脓毒症小鼠的凝血功能, 检测了小鼠CLP后凝血指标的变化。活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 和凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 是反映机体凝血功能的重要检测指标, 分别反映内源性凝血系统功能紊乱和外源性凝血系统功能紊乱。结果显示, CLP术后12 h和24 h, 小鼠APTT和PT均升高, HSF1^{-/-}组明显低于HSF1^{+/+}组, 两组比较有统计学差异 (图2a, b)。结果表明, 脓毒症发生后, 凝血系统被激活, 与脓毒症早期高凝状态相符合, 也说明HSF1对凝血过程激活产生了有效的抑制作用。微血栓形成是脓毒症后凝血活化的重要标志, 而纤维蛋白原是血栓形成的重要反应底物, 在凝血过程中网罗红细胞、血小板等形成稳定血栓结构, 微血栓的形成与纤维蛋白 (原) 的沉积有着密切联系^[24-25]。因此, 观察了脓毒症小鼠肺组织中纤维蛋白 (原) 的沉积。组织免疫荧光结果显

示 (图2c, d), 在CLP后12 h, 即可观察到小鼠肺组织中有纤维蛋白 (原) 沉积, 24 h时逐渐增多, HSF1^{-/-}组小鼠相比HSF1^{+/+}组纤维蛋白 (原) 沉积明显增多, 说明脓毒症小鼠的凝血系统被激活, 大量的纤维蛋白 (原) 形成, 从而促进了微血栓的形成导致组织损伤。同时, 也说明HSF1能够通过减少小鼠肺组织中纤维蛋白 (原) 的沉积改善脓毒症肺损伤。

2.3 HSF1通过增强蛋白质C的表达改善脓毒症小鼠凝血功能障碍

本课题组前期运用组织芯片已发现, 蛋白质C在HSF1^{-/-}组和HSF1^{+/+}组内毒素血症小鼠模型中存在明显差异^[26]。分别收集HSF1^{-/-}和HSF1^{+/+}脓毒症小鼠的血浆并提取肺组织中的mRNA和蛋白质, 检测蛋白质C的表达。结果发现, CLP后血浆中蛋白质C水平升高, 于术后12 h达到高峰, 而HSF1^{-/-}小鼠血浆中的蛋白质C水平明显低于HSF1^{+/+}小鼠 (图3a)。脓毒症造模后24 h, 小鼠肺组织中蛋白质C mRNA和蛋白质水平显著降低, 其中HSF1^{-/-}小鼠显著低于HSF1^{+/+}小鼠 (图3b, c)。

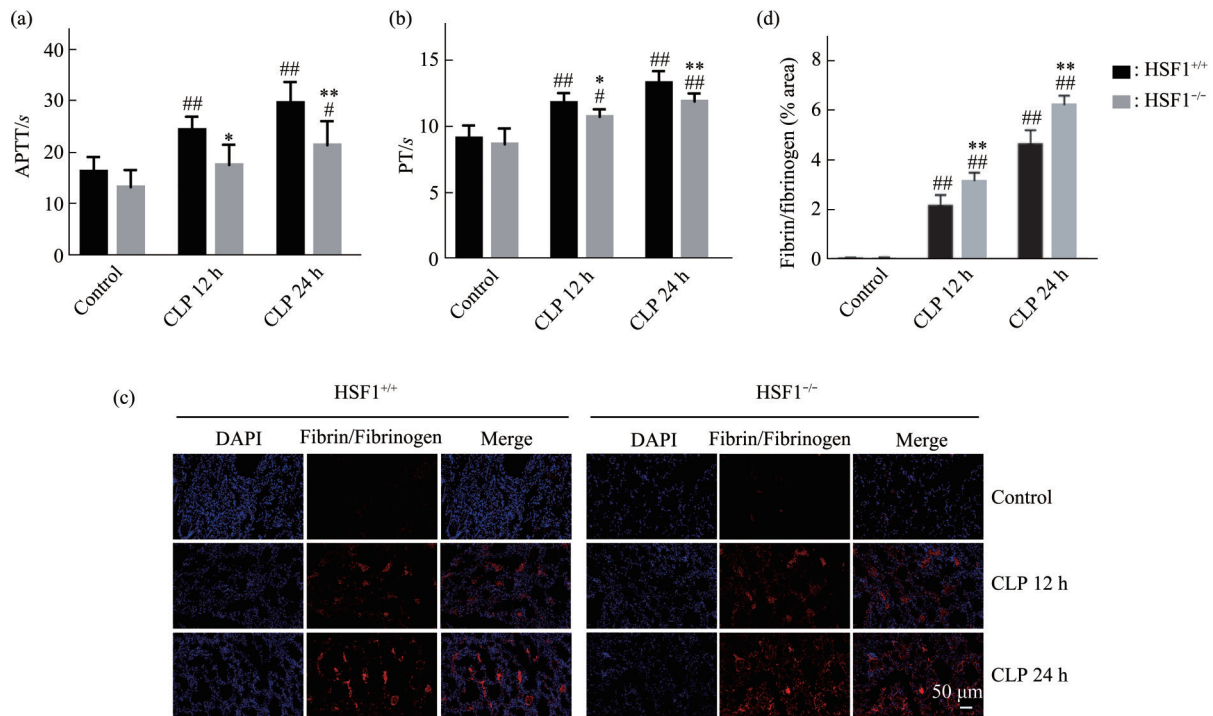


Fig. 2 Effects of HSF1 on the coagulatory function and pulmonary microthrombosis in septic mice

(a) Activated partial prothrombin time (APTT); (b) prothrombin time (PT); (c) immunofluorescence observation of fibrin/fibrinogen deposition in the lung tissue of septic mice; (d) fluorescence quantitative analysis of fibrin/fibrinogen. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs HSF1^{+/+} control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs HSF1^{+/+} CLP; $n = 6$.

以上结果提示，脓毒症发生后，凝血系统功能紊乱同时伴随抗凝血系统的激活，蛋白质C等抗凝血蛋白被释放到血液中，参与了凝血平衡调控，HSF1

可能通过调节蛋白质C表达从而抑制脓毒症小鼠凝血系统活化。

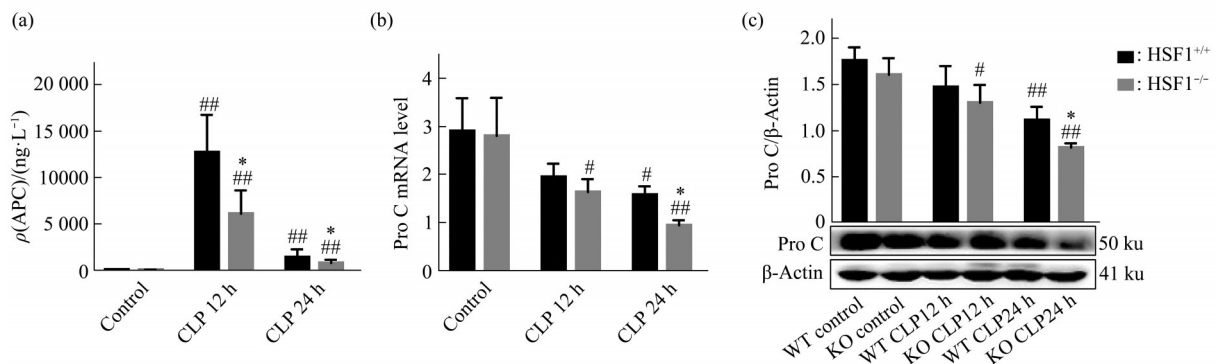


Fig. 3 Effects of HSF1 on the gene expression and protein expression of activated protein C in plasma and lung tissue of septic mice

(a) Activate protein C (APC); (b) qRT-PCR detection of protein C mRNA level in lung tissue; (c) Western blot detection of protein C protein level in lung tissue. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs HSF1^{+/+} control; * $P < 0.05$, vs HSF1^{+/+} CLP; $n = 6$.

2.4 HSF1调控bEnd.3细胞中脂多糖 (LPS) 诱导的蛋白质C表达

为了探究HSF1对蛋白质C表达的调节机制, 采用HSF1 siRNA或HSF1过表达质粒干预LPS刺激的血管内皮bEnd.3细胞。结果发现, LPS刺激bEnd.3细胞后, 蛋白质C mRNA和蛋白质的表达水平均显著增加。当细胞转染HSF1 siRNA, 蛋白

质C mRNA和蛋白质表达水平与对照组细胞比较有显著降低 (图4a, b), 而HSF1过表达使蛋白质C mRNA和蛋白质表达水平显著高于对照组 (图4c, d)。以上结果表明, LPS刺激显著上调bEnd.3细胞中蛋白质C表达, 转染HSF1 siRNA或HSF1过表达质粒分别抑制或促进蛋白质C的上调。

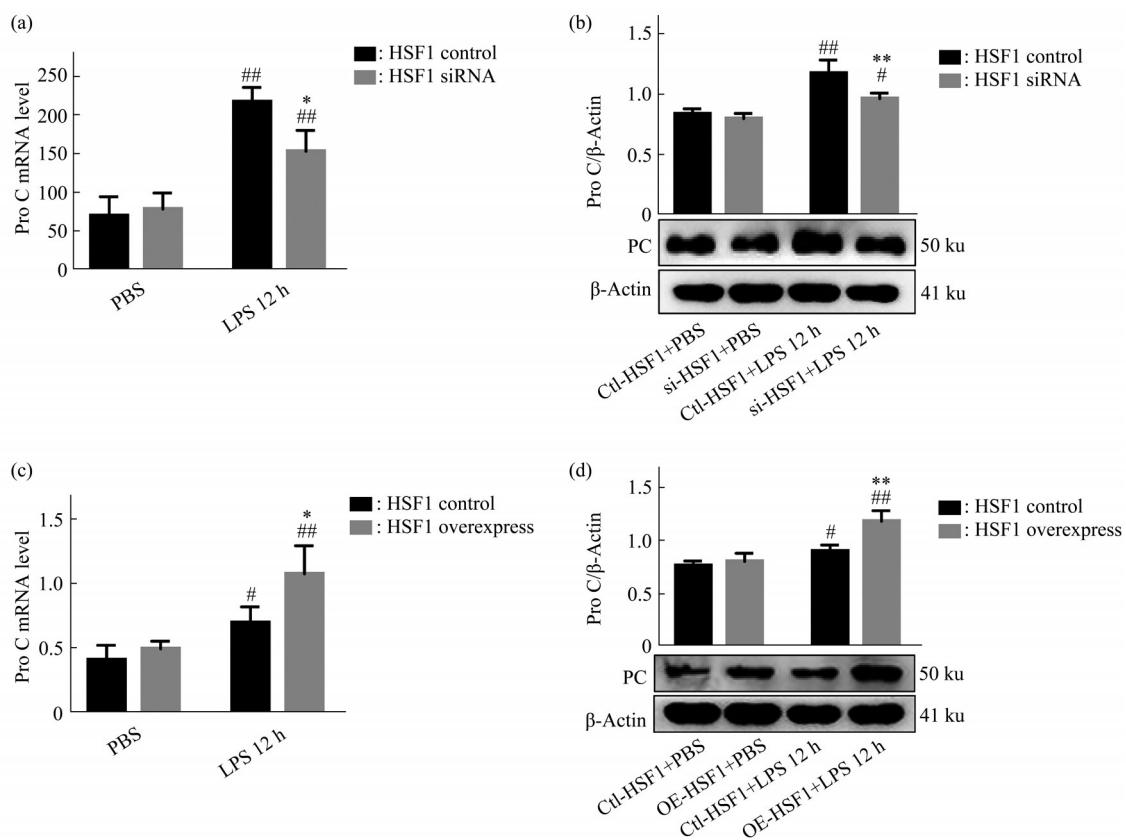


Fig. 4 Effects of HSF1 on protein C mRNA and protein expression level in LPS-stimulated bEnd.3 cells

mRNA (a) and protein (b) levels of protein C in bEnd.3 cells after LPS-stimulated HSF1 interference; mRNA (c) and protein (d) levels of protein C in bEnd.3 cells after LPS-stimulated HSF1 overexpression detection. # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs HSF1 control+PBS; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs HSF1 control+CLP 12 h; $n\geq 3$.

2.5 HSF1通过上调蛋白质C转录保护脓毒症小鼠凝血功能障碍

HSF1作为转录因子, 主要与靶基因的启动子HSE元件结合调控它们的转录。利用生物信息学分析发现在蛋白质C启动子区存在HSF1结合元件(HSE) (图5a, b), 推测HSF1可能通过与蛋白质C启动子区域的HSEs结合, 直接调控蛋白质C的转录。运用EMSA和双荧光素酶报告基因实验探究HSF1是否调控蛋白质C的转录。EMSA实验结

果显示, HSF1可以直接结合蛋白质C启动子区HSE1 (-584~-577 bp) (图5c)。此外, 双荧光素酶报告基因检测显示, 共转染mHSF1质粒和ProC-wt报告质粒后, 荧光强度显著增强。然而, 共转染mHSF1质粒和ProC-mut报告质粒后, 荧光强度显著降低, 与EMSA的结果相一致 (图5d)。以上结果证实了HSF1在蛋白质C的启动子区域与HSEs结合, 从而直接上调蛋白质C的转录。

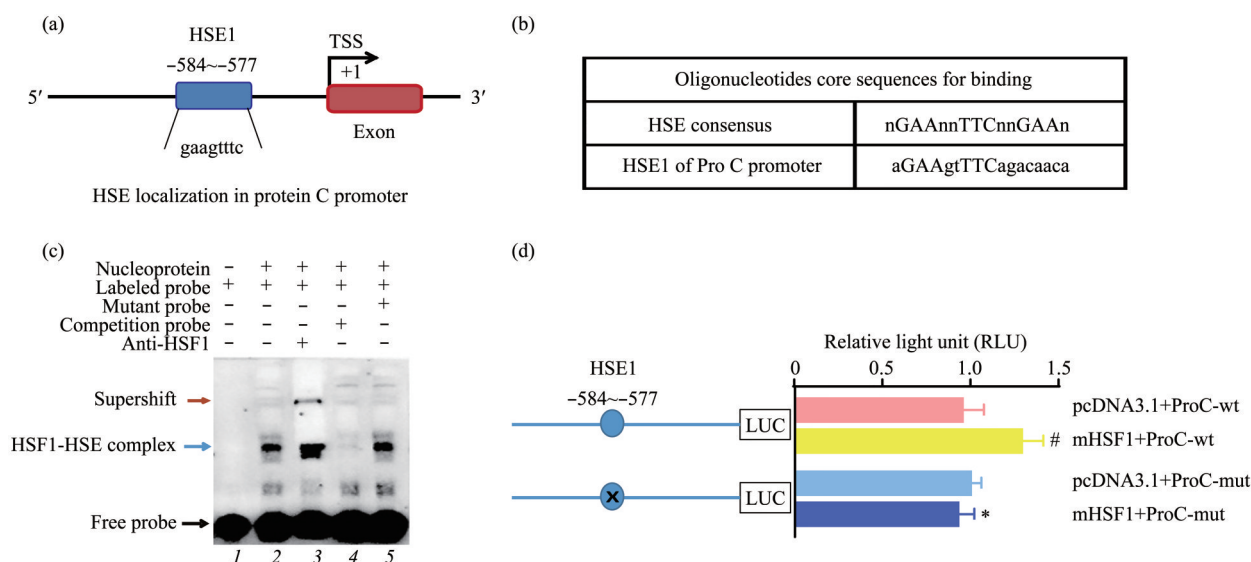


Fig. 5 HSF1 directly upregulates protein C transcription

(a, b) HSE analysis in the promoter region of protein C gene; (c) EMSA result of the binding of HSF1 to HSE in the promoter region of protein C; (d) dual-luciferase reporter gene assay to evaluate the effect of HSF1 on the transcriptional regulation of protein C gene. ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.1+ProC-wt; # $P < 0.05$ mHSF1+ProC-mut vs mHSF1+ProC-wt; $n \geq 3$.

3 讨 论

脓毒症发病机制复杂,病情进展迅速,病死率高。全球每年住院的严重脓毒症病例数接近1900万,其中高达25%的严重脓毒症患者和50%的脓毒性休克患者遭受死亡威胁^[27]。凝血功能紊乱是脓毒症发生发展过程中的重要病理过程,加速脓毒症及多器官功能的恶化^[28-29]。当脓毒症发生时,凝血系统被激活,触发凝血级联反应,血小板消耗减少,微血栓形成,严重者引起DIC,患者可能出现明显的血栓栓塞并发症或临床上表现不易察觉的微血管血栓形成,最终导致多器官功能衰竭^[8-9]。本研究基于HSF1敲除小鼠的CLP模型,证实了HSF1通过参与并抑制脓毒症凝血系统激活,从而减轻小鼠脓毒症所致肺损伤,并首次证实了HSF1通过直接上调蛋白质C的转录对脓毒症凝血功能紊乱起到部分保护作用。

本研究采用的是CLP动物模型,该模型较好地模拟人类的脓毒症,已被认为是研究脓毒症的金标准模型^[30]。在该模型的基础上,首先探讨了HSF1在整体动物水平对组织器官的保护作用,并观察了HSF1是否参与了脓毒症凝血过程。组织病理学结果显示,HSF1敲除小鼠在脓毒症所致肺组织损伤中比野生型小鼠更明显。凝血相关指标

APTT、PT以及肺组织中大量的纤维蛋白(原)沉积也反映了脓毒症后,小鼠凝血系统激活,触发了凝血活化过程,导致微血栓形成,从而加重了肺组织的缺血缺氧和肺功能损伤,且该病理变化在HSF1^{-/-}组小鼠中比在HSF1^{+/+}小鼠更明显,这表明HSF1参与了脓毒症的凝血活化过程,而且HSF1能够有效抑制脓毒症的凝血系统活化从而对脓毒症所致肺损伤起到保护作用。

蛋白质C是一种维生素K依赖的血浆酶原,被凝血酶-凝血调节蛋白复合物激活后形成APC,在凝血的生理调节中起着重要作用^[31]。蛋白质C能够通过APC和凝血酶激活的纤溶抑制剂(TAFI)来调节凝血和纤溶^[32-33]。已有研究表明,在动物模型中,蛋白质C系统的损伤可显著恶化DIC,增加发病率和死亡率,而恢复APC的功能可预防凝血功能障碍,减轻器官功能障碍^[34]。蛋白质C水平的降低和蛋白质C系统的抑制与脓毒症相关凝血功能障碍的发生密切相关^[35]。然而,HSF1是否能通过调控蛋白质C减轻脓毒症的凝血功能障碍尚不清楚。因此,首先构建了HSF1敲除小鼠的脓毒症模型,通过结合前期芯片结果,发现蛋白质C在内毒素血症的HSF1^{-/-}和HSF1^{+/+}小鼠之间存在差异表达。基于此,推测蛋白质C可能在HSF1敲除小鼠的脓毒症肺损伤过程中发挥了重要作用。为了验证

这一假设, 通过对脓毒症小鼠血浆和肺组织进行了ELISA、qRT-PCR和Western blot。结果显示, 脓毒症后小鼠血浆中蛋白质C水平升高, 于12 h达峰值, 随后降低, 且HSF1^{-/-}组水平明显低于HSF1^{+/+}组。脓毒症后, 小鼠肺组织中蛋白质C的蛋白质和mRNA水平均显著下降, 相比HSF1^{+/+}组, HSF1^{-/-}降低更明显, 有明显统计学意义。细胞实验也发现, LPS刺激增加了对照组bEnd.3细胞中蛋白质C的蛋白质和mRNA的表达水平; 而在细胞在转染HSF1 siRNA后, 蛋白质C的蛋白质和mRNA的表达水平相比对照组明显降低, 在HSF1过表达后, 结果发生了相反的变化, 与肺组织的实验相一致。既往研究表明, 在脓毒症中, 凝血系统的激活导致活化蛋白质C系统严重破坏, 是由于其持续的消耗和蛋白质降解^[36], 致其水平显著降低。在严重脓毒症时, 内源性不活跃的前体蛋白质C的水平由于其在肝脏产生减少以及酶降解作用(如中性粒细胞弹性蛋白酶)而降低, 以及显著下调血栓调节蛋白和内皮蛋白质C受体, 导致蛋白质C活化为APC量受损明显^[37-38]。研究的结果与这些报告相一致。本研究表明, 蛋白质C在脓毒症早期阶段快速分泌以增加其抗凝功能, 之后因快速消耗和蛋白质降解大量减少, 削弱了其对凝血过程的抑制作用从而加速了微血栓的形成。在此过程中, 也发现HSF1对肺组织和细胞中蛋白质C的表达变化具有调控作用从而抑制凝血系统激活从而减轻脓毒症器官损伤。

HSF1是机体内重要的转录因子, 通过对多种基因的调控影响了疾病的发病过程。在应激状态下, HSF1被激活形成三聚体, 然后移位到细胞核中, 与基因启动子区域的特定HSE元件结合, 启动热休克(应激)基因的转录激活^[39-40]。此外, HSF1也通过调节多种炎症因子的表达, 参与了炎症反应过程^[15, 41]。本研究中, 分析了蛋白质C启动子区域的序列, 并确定了在基因启动子区域含有HSEs, 基于HSF1的作用机制, 推测HSF1可能通过与蛋白质C启动子的HSEs结合, 直接调控蛋白质C的转录。为了验证上述假说, 分别进行了EMSA和双荧光素酶报告基因分析, EMSA结果显示HSF1可以与蛋白质C启动子区域的一个HSE(-584~-577 bp)结合。双荧光素酶报告基因检测结果进一步揭示了HSF1直接上调蛋白质C的转录。以上结果一致证实HSF1通过与蛋白质C启动子中HSEs结合, 上调蛋白质C的转录水平, 抑制脓毒症的凝血活化过程, 从而减轻小鼠肺组织损伤。

4 结 论

本研究探讨了HSF1在脓毒症发生发展中的作用, 揭示了HSF1参与脓毒症急性肺损伤的发生过程。HSF1通过直接上调蛋白质C的转录抑制脓毒症凝血活化过程从而减轻急性肺损伤的发生发展。本研究不仅揭示了脓毒症凝血功能障碍的发生机制, 而且为脓毒症中凝血功能障碍的干预提供了新的理论依据。

推荐编委 熊炜

参 考 文 献

- [1] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 2016, **315**(8): 801-810
- [2] Shankar-Hari M, Phillips G S, Levy M L, *et al.* Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 2016, **315**(8): 775-787
- [3] Seymour C W, Liu V X, Iwashyna T J, *et al.* Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 2016, **315**(8): 762-774
- [4] Komorowski M, Celi L A, Badawi O, *et al.* The artificial intelligence clinician learns optimal treatment strategies for sepsis in intensive care. *Nat Med*, 2018, **24**(11): 1716-1720
- [5] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari N K, *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, **193**(3): 259-272
- [6] Jawad I, Lukšić I, Rafnsson S B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health*, 2012, **2**(1): 010404
- [7] Angus D C, Van Der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013, **369**(21): 2063
- [8] Venugopal A. Disseminated intravascular coagulation. *Indian J Anaesth*, 2014, **58**(5): 603-608
- [9] Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie*, 2010, **30**(1): 10-12, 14-16
- [10] Gando S, Saitoh D, Ishikura H, *et al.* A randomized, controlled, multicenter trial of the effects of antithrombin on disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. *Crit Care*, 2013, **17**(6): R297
- [11] Tang D, Kang R, Xiao W, *et al.* Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide) - induced hmgb1 cytoplasmic translocation and release. *J Immunol*, 2007, **178**(11): 7376-7384
- [12] Tang D, Kang R, Xiao W, *et al.* The anti-inflammatory effects of

- heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *J Immunol*, 2007, **179**(2): 1236-1244
- [13] Zhang L, Yang M, Wang Q, *et al.* Hsf1 regulates expression of g-csf through the binding element for NF-IL6/CCAAT enhancer binding protein beta. *Mol Cell Biochem*, 2011, **352**(1-2): 11-17
- [14] Tong Z, Jiang B, Zhang L, *et al.* HSF-1 is involved in attenuating the release of inflammatory cytokines induced by LPS through regulating autophagy. *Shock*, 2014, **41**(5): 449-453
- [15] Zhang H, Zhang L, Yu F, *et al.* HSF1 is a transcriptional activator of IL-10 gene expression in raw264.7 macrophages. *Inflammation*, 2012, **35**(4): 1558-1566
- [16] Xiao X, Zuo X, Davis A A, *et al.* Hsf1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*, 1999, **18**(21): 5943-5952
- [17] Hubbard W J, Choudhry M, Schwacha M G, *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock*, 2005, **24** (Suppl 1): 52-57
- [18] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 2009, **4**(1): 31-36
- [19] Mcmillan D R, Xiao X, Shao L, *et al.* Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 1998, **273**(13): 7523-7528
- [20] Goldenberg C J, Luo Y, Fenna M, *et al.* Purified human factor activates heat shock promoter in a hela cell-free transcription system. *J Biol Chem*, 1988, **263**(36): 19734-19739
- [21] Choi H S, Lin Z, Li B S, *et al.* Age-dependent decrease in the heat-inducible DNA sequence-specific binding activity in human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, 1990, **265**(29): 18005-18011
- [22] Li T, Xiao G, Tan S, *et al.* HSF1 attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by suppressing macrophage infiltration. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, **2020**: 1936580
- [23] Su X, Wang L, Song Y, *et al.* Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Intensive Care Med*, 2004, **30**(1): 133-140
- [24] Yasui H, Donahue D L, Walsh M, *et al.* Early coagulation events induce acute lung injury in a rat model of blunt traumatic brain injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, **311**(1): L74-L86
- [25] McGraw M D, Osborne C M, Mastej E J, *et al.* Editor's highlight: pulmonary vascular thrombosis in rats exposed to inhaled sulfur mustard. *Toxicol Sci*, 2017, **159**(2): 461-469
- [26] 于凤秀,张华莉,陈广文,等. HSF1 调控的炎症相关基因的筛选及 SOCS3 基因的实验验证. *中南大学学报(医学版)*, 2006, **31**(2): 162-173
- Yu F, Zhang H, Chen G, *et al.* Journal of Central South University (Medical Sciences), 2006, **31**(2): 162-173
- [27] Mayr F B, Yende S, Linde-Zwirble W T, *et al.* Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*, 2010, **303**(24): 2495-2503
- [28] Van Der Poll T, Levi M. Crosstalk between inflammation and coagulation: the lessons of sepsis. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, **10**(5): 632-638
- [29] Del Vecchio A, Stronati M, Franco C, *et al.* Bi-directional activation of inflammation and coagulation in septic neonates. *Early Hum Dev*, 2014, **90** (Suppl 1): S22-S25
- [30] Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. *Trends Microbiol*, 2011, **19**(4): 198-208
- [31] Wypasek E, Undas A. Protein C and protein S deficiency - practical diagnostic issues. *Adv Clin Exp Med*, 2013, **22**(4): 459-467
- [32] Griffin J H, Fernández J A, Gale A J, *et al.* Activated protein C. *J Thromb Haemost*, 2007, **5** (Suppl 1): 73-80
- [33] Bajzar L, Nesheim M E, Tracy P B. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood*, 1996, **88**(6): 2093-2100
- [34] Levi M, Schultz M, Van Der Poll T. Sepsis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2013, **39**(5): 559-566
- [35] Mann H J, Short M A, Schlichting D E. Protein C in critical illness. *Am J Health Syst Pharm*, 2009, **66**(12): 1089-1096
- [36] Levi M, Poll T. Coagulation in patients with severe sepsis. *Semin Thromb Hemost*, 2015, **41**(1): 9-15
- [37] Aird W C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 2003, **101**(10): 3765-3777
- [38] Macias W L, Yan S B, Williams M D, *et al.* New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care*, 2005, **9** (Suppl 4): S38-S45
- [39] Villar J, Ribeiro S P, Mullen J B, *et al.* Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med*, 1994, **22**(6): 914-921
- [40] Pespeni M, Mackersie R C, Lee H, *et al.* Serum levels of HSP60 correlate with the development of acute lung injury after trauma. *J Surg Res*, 2005, **126**(1): 41-47
- [41] Xie Y, Chen C, Stevenson M A, *et al.* Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1beta gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6. *J Biol Chem*, 2002, **277**(14): 11802-11810

HSF1 Attenuates Coagulatory Dysfunction and Protects Mice From Acute Lung Injury by Upregulating Protein C in Sepsis*

WANG Hao^{1,2,3)}, LI Tao⁴⁾, XIAO Gui⁵⁾, LIU Mei-Dong^{1,2,3)}, LIU Ke^{1,2,3)}, ZHANG Hua-Li^{1,2,3)},
ZHU Ya-Xi^{1,2,3)}**, XIAO Xian-Zhong^{1,2,3)}**

⁽¹⁾Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine Science, Central South University, Changsha 410008, China;

⁽²⁾Sepsis Translational Medicine Key Laboratory of Hunan Province, Central South University, Changsha 410008, China;

⁽³⁾National Medicine Functional Experimental Teaching Center, Central South University, Changsha 410078, China;

⁽⁴⁾Department of Pathophysiology, Medicine College of Jiaying University, Meizhou 514031, China;

⁽⁵⁾Xiangya School of Nursing, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract Objective To explore the mechanism of heat shock factor (HSF1) alleviating coagulatory dysfunction in sepsis and protecting mice from acute lung injury. **Methods** In this study, a mouse model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP). We tested the coagulation indexes and pathological changes in the lungs of mice. Protein C expression was detected by ELISA, qRT-PCR and Western blotting. The expression level of protein C was observed by inhibiting or enhancing the expression of HSF1 by plasmid transfection, and the mechanism of HSF1 regulating protein C transcription was explored by bioinformatics, EMSA and dual luciferase reporter gene experiments. **Results** In the mouse model of sepsis, we discovered that the coagulatory activity of the HSF1^{-/-} mice was significantly enhanced and the lung injury was aggravated after CLP, compared with the HSF1^{+/+} mice. ELISA, qRT-PCR and Western blot showed that the expression level of protein C in the plasma and lung tissue of the HSF1^{-/-} mice was lower than that in the wild-type mice in sepsis. *In vitro* studies also demonstrated that HSF1 interference inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced protein C expression, while HSF1 overexpression enhanced protein C expression in bEnd.3 vascular endothelial cells. Further bioinformatics analysis indicated that the protein C promoter region contains HSF1 binding element (HSE). EMSA and dual luciferase reporter gene experiments showed that HSF1 bound to the HSE in the promoter region of protein C, thereby directly upregulating protein C transcription. **Conclusion** This study revealed that HSF1 was involved in acute lung injury in sepsis mouse model. HSF1 alleviated the coagulatory dysfunction in sepsis by directly upregulating protein C transcription, thus playing a protective role in mouse lung tissue.

Key words HSF1, sepsis, protein C, coagulation, acute lung injury

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0091

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81871610, 82172146, 82000742).

** Corresponding author.

XIAO Xian-Zhong. Tel: 86-731-82355020, E-mail: xiaoxianzhong@csu.edu.cn

ZHU Ya-Xi. Tel: 86-731-82355020, Email: zhu_yaxi@csu.edu.cn

Received: March 15, 2022 Accepted: March 23, 2022