

沉默凝血因子 V 基因通过抑制 JNK1/2 和 p38 MAPK 信号通路 对脓毒症大鼠的保护作用

王镜媛, 陈 芳, 刘艳存, 李士欣, 寿松涛
(天津医科大学总医院急诊医学科, 天津 300052)

[摘 要] **目的:** 探讨凝血因子 V (FV) 对脓毒症大鼠免疫炎症反应和 c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK1/2) 及 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 信号通路的影响, 阐明其可能的机制。**方法:** 将 150 只大鼠分为假手术组、模型组、sh-NC 组、sh-FV 组和茴香霉素组, 每组 30 只。采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 法构建脓毒症模型。观察各组大鼠造模后 5 d 的生存率。采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠肺、肾、肝和脾脏组织病理形态表现, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组大鼠肺组织中 FV mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组大鼠肺组织中 FV、JNK1/2 和 p38 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组大鼠血清中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, 流式细胞术检测各组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率和 T 淋巴细胞亚群百分率。**结果:** 与模型组和 sh-NC 组比较, sh-FV 组大鼠生存率明显升高 ($P < 0.05$); 与 sh-FV 组比较, 茴香霉素组大鼠生存率明显降低 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组和 sh-NC 组大鼠肺组织中 FV mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和 sh-NC 组比较, sh-FV 组大鼠肺组织中 FV mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组和 sh-NC 组大鼠肺组织中 FV 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), p-JNK1/2/JNK1/2 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和 sh-NC 组比较, sh-FV 组大鼠肺组织中 FV 蛋白表达水平和 p-JNK1/2/JNK1/2 及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值明显降低 ($P < 0.05$); 与 sh-FV 组比较, 茴香霉素组大鼠肺组织中 p-JNK1/2/JNK1/2 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值明显升高 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组和 sh-NC 组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和 sh-NC 组比较, sh-FV 组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 sh-FV 组比较, 茴香霉素组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$)。流式细胞术, 与假手术组比较, 模型组和 sh-NC 组大鼠中性粒细胞凋亡率、CD4⁺T 淋巴细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值明显降低 ($P < 0.05$), CD8⁺T 淋巴细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和 sh-NC 组比较, sh-FV 组大鼠中性粒细胞凋亡率、CD4⁺T 淋巴细胞百分率和 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值明显升高 ($P < 0.05$), CD8⁺T 淋巴细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$); 与 sh-FV 组比较, 茴香霉素组大鼠中性粒细胞凋亡率、CD4⁺T 淋巴细胞百分率和 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值明显降低 ($P < 0.05$), CD8⁺T 淋巴细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 沉默 FV 基因可减轻脓毒症大鼠肺、肝、脾脏和肾脏组织损伤, 诱导血液中性粒细胞凋亡, 降低血清中炎症因子水平, 提高血液中 CD4⁺T 淋巴细胞百分率和 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值, 其机制可能与抑制 JNK1/2 和 p38 MAPK 信号通路有关。

[关键词] 凝血因子 V; c-Jun 氨基末端激酶 1/2; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 脓毒症; 免疫炎症

[收稿日期] 2025-03-18

[录用日期] 2025-04-30

[基金项目] 天津市卫健委卫生健康科技项目 (TJWJ2021MS887); 吴阶平医学基金会临床研究课题项目 (320.6750.2022-26-7)

[作者简介] 王镜媛 (1987—), 女, 山东省聊城市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事脓毒症凝血功能方面的研究。

[通信作者] 寿松涛, 主任医师, 博士研究生导师 (E-mail: z2026sst02@163.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[中图分类号] R364.5 [文献标志码] A

Protective effect of silencing coagulation factor V gene on septic rats by inhibiting JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways

WANG Jingyuan, CHEN Fang, LIU Yancun, LI Shixin, SHOU Songtao

(Department of Emergency Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of coagulation factor V (FV) on the immune inflammatory response and the c-Jun N-terminal kinase 1/2 (JNK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathways in the septic rats, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** A total of 150 rats were divided into sham operation group, model group, sh-NC group, sh-FV group, and anisomycin group, with 30 rats in each group. The sepsis model was established by cecal ligation and puncture (CLP) method. The survival rates of the rats in various groups within 5 d after modeling were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathomorphology of lung, kidney, liver, and spleen tissues of the rats in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of FV mRNA in lung tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of FV, JNK1/2, and p38 MAPK signaling pathway-related proteins in lung tissue of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of the rats in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of neutrophils and the percentages of T lymphocyte subsets in blood of the rats in various groups. **Results:** Compared with model group and sh-NC group, the survival rate of the rats in sh-FV group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with sh-FV group, the survival rate of the rats in anisomycin group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with sham operation group, the expression levels of FV mRNA in lung tissue of the rats in model group and sh-NC group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group and sh-NC group, the expression level of FV mRNA in lung tissue of the rats in sh-FV group was significantly decreased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with sham operation group, the expression levels of FV protein in lung tissue of the rats in model group and sh-NC group were significantly increased ($P < 0.05$), and the ratios of p-JNK1/2/JNK1/2 and p-p38 MAPK/p38 MAPK were significantly increased ($P > 0.05$); compared with model group and sh-NC group, the expression level of FV protein and the ratios of p-JNK1/2/JNK1/2 and p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissue of the rats in sh-FV group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with sh-FV group, the ratios of p-JNK1/2/JNK1/2 and p-p38 MAPK/p38 MAPK in lung tissue of the rats in anisomycin group were significantly increased ($P < 0.05$). The ELISA results showed that compared with sham operation group, the serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α of the rats in model group and sh-NC group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group and sh-NC group, the serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α of the rats in sh-FV group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with sh-FV group, the serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α of the rats in anisomycin group were significantly increased ($P < 0.05$). The flow cytometry results showed that compared with sham operation group, the apoptotic rates of neutrophils, the percentage of CD4 $^{+}$ T lymphocytes, and the ratios of CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T lymphocytes of the rats in model group and sh-NC group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the percentages of CD8 $^{+}$ T lymphocytes were significantly increased ($P < 0.05$);

compared with model group and sh-NC group, the apoptotic rate of neutrophils, the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes, and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ T lymphocytes of the rats in sh-FV group were significantly increased ($P<0.05$), while the percentage of $CD8^+$ T lymphocytes was significantly decreased ($P<0.05$); compared with sh-FV group, the apoptotic rate of neutrophils, the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes, and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ T lymphocytes of the rats in anisomycin group were significantly decreased ($P<0.05$), while the percentage of $CD8^+$ cells was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Silencing FV gene can alleviate the damage of lung, liver, spleen, and kidney tissues, induce the apoptosis of blood neutrophils, reduce the serum levels of inflammatory factors, and increase the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ T lymphocytes in blood of the septic rats. Its mechanism may be related to the inhibition of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways.

KEYWORDS Coagulation factor V; c-Jun N-terminal kinase 1/2; p38 mitogen-activated protein kinase; Sepsis; Immune inflammation

脓毒症是一种由宿主对广泛感染产生过度免疫反应而导致的危及生命的器官功能障碍^[1],其特征是促炎和抗炎细胞因子的过度产生,导致短暂严重淋巴细胞减少和长期免疫功能障碍。2020年数据^[2]显示:全球每日有超14 000人死于脓毒症,其高发病率和死亡率高严重威胁人类健康。随着器官支持技术和替代疗法的不断进步,多数脓毒症患者能度过急性炎症反应阶段,但恢复期可能出现以免疫麻痹为特征的长期免疫功能障碍,增加继发性感染风险^[3]。因此,明确脓毒症特异性的免疫炎症生物标志物,对该疾病的早期识别和精准干预有重大意义。脓毒症常并发弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC),进一步加剧微循环衰竭和多器官损伤,形成炎症与凝血的恶性循环^[4]。然而,目前针对脓毒症免疫炎症机制及其干预靶点的认识仍不完全,尤其是凝血因子在免疫调节中的具体作用尚未完全阐明。凝血因子V(coagulation factor V, FV)作为凝血级联反应的核心辅助因子,其传统功能主要为促进凝血酶原激活^[5]。FV在脓毒症中的直接作用尚不明确,但已有研究^[6]证实FV在脓毒症“炎症-凝血交叉反应”中发挥关键作用。p38激酶和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)作为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员,是经典的炎症相关信号通路^[7],但FV与MAPK信号通路的交互作用尚未得到系统研究。有研究^[8]提示凝血因子可能通过蛋白酶激活受体或直接细胞内信号转导影响炎症反应,但缺乏针对FV在脓毒症免疫调节中具体机制的直接证据。本研究通过构建脓毒症大鼠模型,初步探讨FV对脓毒症大鼠免疫炎症反应的影响,并

探索其对MAPK信号通路的影响,以期开发脓毒症靶向治疗策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 150只雄性SPF级SD大鼠,体质量250 g~300 g,均购自天津科德生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(津滨)2021-0001。所有大鼠在无特定病原体、温度(25±1)℃且湿度55%~65%环境下饲养,每笼5只,并可自由获取无菌饲料和饮用水。靶向沉默FV基因的短发夹(short hairpin, sh)RNA sh-FV及其阴性对照均购自上海吉玛制药技术有限公司, JNK1/2和p38 MAPK通路激活剂茴香霉素购自上海翌圣生物科技有限公司; HE染色试剂盒、TRIzol试剂和SYBR Green Mix试剂购自北京索莱宝生物技术有限公司,白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂及CD4-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/CD8-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)抗体购自美国eBioscience公司, FV抗体、JNK1/2抗体、磷酸化JNK1/2(phosphorylated JNK1/2, p-JNK1/2)抗体、p38 MAPK抗体、磷酸化p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自美国Abcam公司,外周血分离试剂Histopaque 1119和Histopaque 1083购自美国Sigma公司。多功能酶标仪购自美国Thermo Fisher公司,奥林巴斯IX-83显微镜购自上海普赫光电科

技有限公司, Tannon-420 凝胶成像系统购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 实验动物分组和脓毒症大鼠模型的制备 将大鼠分为假手术组、模型组、sh-NC组、sh-FV组和茴香霉素组, 每组30只。造模前7 d, sh-NC组和sh-FV组大鼠尾静脉注射给予100 μL sh-NC及sh-FV; 茴香霉素组为sh-FV和茴香霉素共处理, 大鼠尾静脉注射sh-FV后腹腔注射5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 茴香霉素^[9]; 假手术组和模型组大鼠注射等量的生理盐水, 每日1次。脓毒症动物模型的构建参照文献[10]中描述的盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)方法。大鼠通过腹腔注射0.01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 戊巴比妥溶液进行麻醉(剂量为每20 g体质量给药120 μL), 随后进行腹部区域的剃毛与消毒处理。在无菌条件下, 小心剖开腹腔以暴露盲肠, 使用3-0规格的丝线结扎盲肠总长度的60%部分。使用27号针头在盲肠的头端和尾端各穿刺1个孔, 并轻微挤压以排出少量肠内容物。操作完成后, 将盲肠重新置回腹腔, 并使用无菌缝合线对腹部进行逐层关闭。假手术组采用相似的盲肠操作过程, 但未进行结扎与穿刺步骤。

1.3 各组大鼠存活情况和组织样品采集 从各组大鼠中随机选择10只, 监测造模后5 d各组大鼠的存活率。剩余大鼠分别于术后24 h, 抽取下腔静脉血后, 将其安乐死, 分离肺、肾、肝和脾脏组织, 用于后续实验。

1.4 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组大鼠肺组织中FV mRNA表达水平 采用TRIzol试剂从肺组织中提取总RNA, 并选取10 μg RNA反转录为cDNA。RT-qPCR实验采用SYBR Green Mix作为荧光标记物, 以GAPDH作为内参基因, 对目的基因表达水平进行标准化处理。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性60 s; 随后进行40个循环, 每个循环包括95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火与延伸40 s。引物序列: FV F, 5'-AATTCT-ATACCTTCCTTCAAGA-3', FV R, 5'-AGTT-GCTAGATCGTGG-3'; GAPDH F, 5'-GTGTTCTACCCCCAATGTG-3', GAPDH R, 5'-CATCG-AAGGTGGAAGAGTGG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算肺组织中FV mRNA表达水平。每组设置3个重复样本。

1.5 Western blotting法检测各组大鼠肺组织中FV、p-JNK1/2、JNK1/2、p-p38 MAPK和p38 MAPK蛋白表达水平 取各组10只大鼠肺组织样本, 研磨

后加入RIPA裂解缓冲液进行蛋白质提取。使用二喹啉甲酸蛋白质定量试剂盒对提取的蛋白质浓度进行精确测定。将等量的蛋白质样本通过100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行分离, 并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用含5%脱脂牛奶对膜进行封闭处理。经过含Tween-20的Tris缓冲盐溶液洗涤后, 将膜与一抗在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。次日, 加入二抗在室温下孵育2 h。采用Tannon 4200凝胶成像系统对蛋白质条带进行可视化处理, 分析蛋白条带灰度值, 以GAPDH为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.6 HE染色观察各组大鼠肺、肝、脾和肾脏组织病理形态表现 取各组10只大鼠各脏器样本, 采用4%甲醛溶液进行固定处理, 随后实施石蜡包埋步骤。利用试剂盒制备得到切片, 切片经去石蜡和复水步骤后, 使用HE染色法进行染色, 于显微镜下对处理后的切片拍照。

1.7 采用试剂盒检测各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平 取各组10只大鼠血液样本, 离心后获得血清, 严格依照说明书操作, 使用ELISA试剂盒测定各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。

1.8 各组大鼠血液中性粒细胞的分离 取各组10只大鼠下腔静脉采集的血液样本与Histopaque 1119和Histopaque 1083混合后, 700 g离心30 min后, 可见样本分层, 分离并收集富含中性粒细胞的富集层。随后使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)对收集的细胞进行洗涤, 共洗涤3次, 前2次洗涤主要目的是去除溶解的红细胞成分, 最后一次洗涤则可进一步纯化细胞。采用瑞氏-姬姆萨染色法对中性粒细胞进行染色鉴定, 中性粒细胞纯度超过95%时可用于后续的实验研究。

1.9 流式细胞术检测各组大鼠血液中性粒细胞凋亡率和T淋巴细胞亚群百分率 各组取实验大鼠下腔静脉血液样本450 μL , 分别向样本中加入5 μL Annexin V-FITC荧光标记溶液和50 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液, 于室温条件下避光孵育15 min。采用流式细胞术检测各组大鼠血液中性粒细胞凋亡率。

另取各组10只大鼠血液样本, 每只500 μL 。设置

实验组（标记为管 1）和对照组（标记为管 2）。实验组加入 20 μL 特异性标记抗体，对照组则加入同型对照抗体。充分混匀后，2 管中分别加入 100 μL 抗凝全血，于暗处孵育 10~15 min 以完成细胞染色。加入 PBS 缓冲液漂洗 1 次，去除上清液后，再加入 0.5 mL PBS 缓冲液以重悬细胞。使用流式细胞仪，依据正向和侧向散射光信号对淋巴细胞进行分群，并准确评估特异性标记阳性细胞 CD4^+ 和 CD8^+ T 淋巴细胞所占百分比，计算 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞比值。

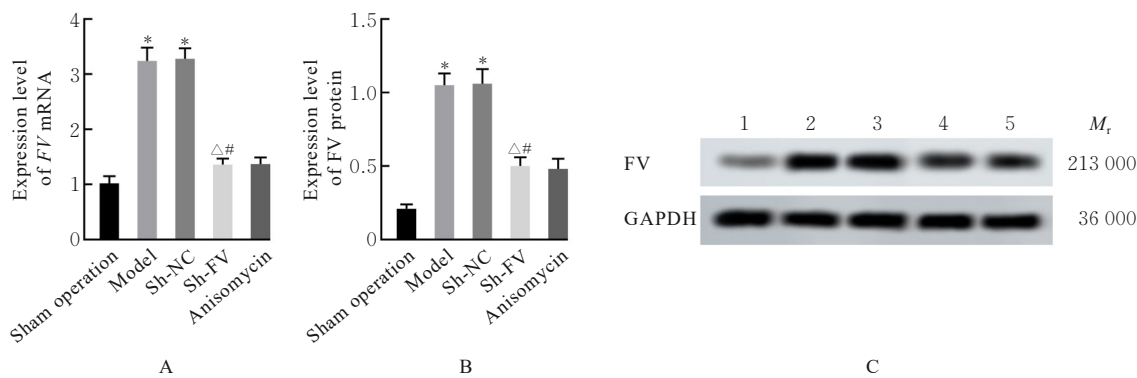
1.10 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。各组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 和蛋白表达水平，血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平，血液中中性粒细胞凋亡率、 CD4^+ 和 CD8^+ T 淋巴细胞百分率、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞比值及肺组织中 p-JNK1/2/JNK1/2 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK

比值均符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用 Tukey 法。各组大鼠生存率为计数资料，以 *n* (%) 表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 和蛋白表达水平

与假手术组比较，模型组和 sh-NC 组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，sh-*FV* 组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。sh-*FV* 组和茴香霉素组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 及蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。



A: Expression level of *FV* mRNA; B: Expression level of *FV* protein; C: Electrophoregram. Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3: Sh-NC group; Lane 4: Sh-*FV* group; Lane 5: Anisomycin group. * $P<0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with sh-NC group.

图 1 各组大鼠肺组织中 *FV* mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 Expression levels of *FV* mRNA and protein in lung tissue of rats in various groups

2.2 各组大鼠生存率 造模后观察 5 d，假手术组大鼠生存率为 100%。与假手术组比较，造模后第 1、3 和 5 天模型组及 sh-NC 组大鼠生存率明显降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，造模后第 3 和 5 天 sh-*FV* 组大鼠生存率明显升高 ($P<0.05$)；与 sh-NC 组比较，造模第 1、3 和 5 天 sh-*FV* 组大鼠生存率明显升高 ($P<0.05$)；与 sh-*FV* 组比较，造模第 1、3 和 5 天茴香霉素组大鼠生存率明显降低 ($P<0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠肺、肝、脾和肾脏组织病理形态表现

假手术组大鼠肺、肝、脾和肾脏组织的结构保持完整。模型组和 sh-NC 组大鼠肺组织出现肺泡间隔明显增宽、大量炎症细胞浸润及血管周围出血的情况；sh-*FV* 组大鼠肺泡结构有所恢复，接近正常状态，出

表 1 各组大鼠生存情况
Tab. 1 Survival of rats in various groups
[$n=10$, $n(\eta/\%)$]

Group	Survival number			
	(t/d) 0	1	3	5
Sham operation	10(100.00)	10(100.00)	10(100.00)	10(100.00)
Model	10(100.00)	8(80.00)*	5(50.00)*	2(20.00)*
Sh-NC	10(100.00)	9(90.00)	5(50.00)*	3(30.00)*
Sh- <i>FV</i>	10(100.00)	10(100.00)#	8(80.00) Δ #	6(60.00) Δ #
Anisomycin	10(100.00)	8(80.00) $\circ$	6(60.00) $\circ$	3(30.00) $\circ$

* $P<0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with sh-NC group; $\circ P<0.05$ compared with sh-*FV* group.

血情况得到缓解, 炎性细胞浸润程度降低; 茴香霉素组大鼠肺组织损伤程度与sh-FV组比较更为严重。

模型组和sh-NC组大鼠肝脏组织中出现肝索结构紊乱及肝细胞排列散乱, 伴有坏死及炎性细胞浸润; sh-FV组大鼠肝细胞排列较整齐, 肝组织中炎性细胞浸润减轻。模型组和sh-NC组大鼠脾脏组织可见大量炎症细胞聚集, 并伴随细胞肿胀与浸润;

sh-FV组大鼠脾脏组织细胞水肿减轻, 结构紊乱及炎症细胞浸润程度均有明显改善; 与sh-FV组比较, 茴香霉素组大鼠脾脏组织损伤程度加剧。

模型组和sh-NC组大鼠出现了肾小球肥大及肾小管铸型形成, 并伴有炎性细胞浸润; sh-FV组大鼠肾脏组织中上述症状有所减轻; 茴香霉素组大鼠肾脏组织损伤程度更为严重。见图2。

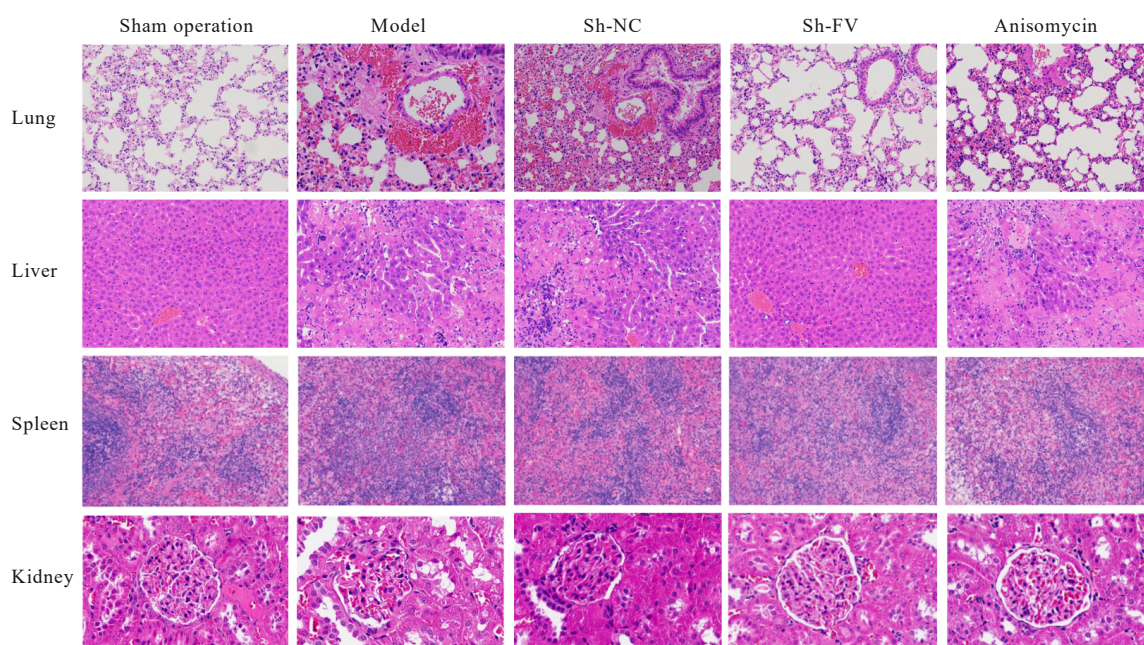


图2 各组大鼠各脏器组织病理形态表现(HE, ×200)

Fig. 2 Pathomorphology of various organ tissues of rats in various groups(HE, ×200)

2.4 各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平

与假手术组比较, 模型组和sh-NC组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和sh-NC组比较, sh-FV组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与sh-FV组比较, 茴香霉素组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。见图3。

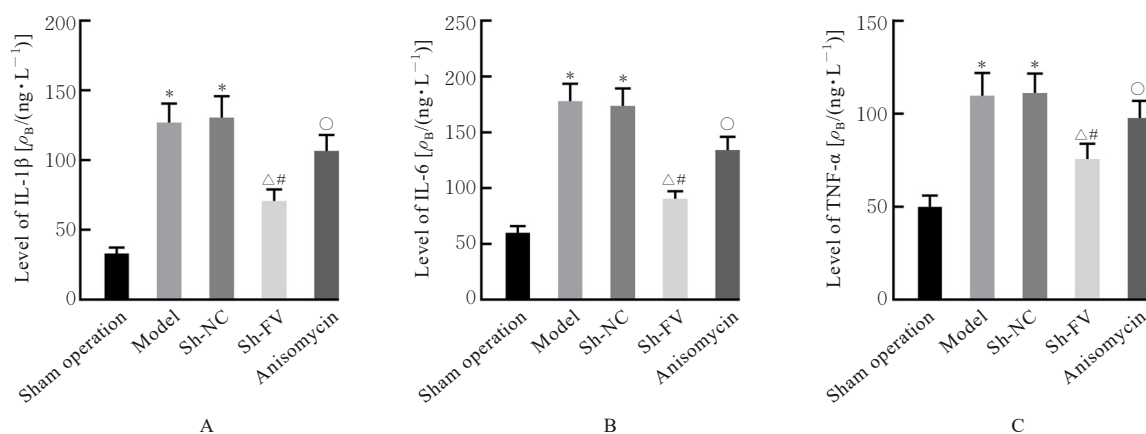
2.5 各组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率 与假手术组比较, 模型组和sh-NC组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组和sh-NC组比较, sh-FV组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与sh-FV组比较, 茴香霉素组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。见图4和5。

2.6 各组大鼠血液中T淋巴细胞亚群百分率 与假手术组比较, 模型组和sh-NC组大鼠血液中

CD4 $^{+}$ T淋巴细胞百分率及CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T淋巴细胞比值明显降低 ($P < 0.05$), CD8 $^{+}$ T淋巴细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和sh-NC组比较, sh-FV组大鼠血液中CD4 $^{+}$ T淋巴细胞百分率和CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T淋巴细胞比值明显升高 ($P < 0.05$), CD8 $^{+}$ T淋巴细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$); 与sh-FV组比较, 茴香霉素组大鼠血液中CD4 $^{+}$ T淋巴细胞百分率和CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T淋巴细胞比值明显降低 ($P < 0.05$), CD8 $^{+}$ T淋巴细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$)。见图6和7。

2.7 各组大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2和p-p38 MAPK/p38 MAPK比值

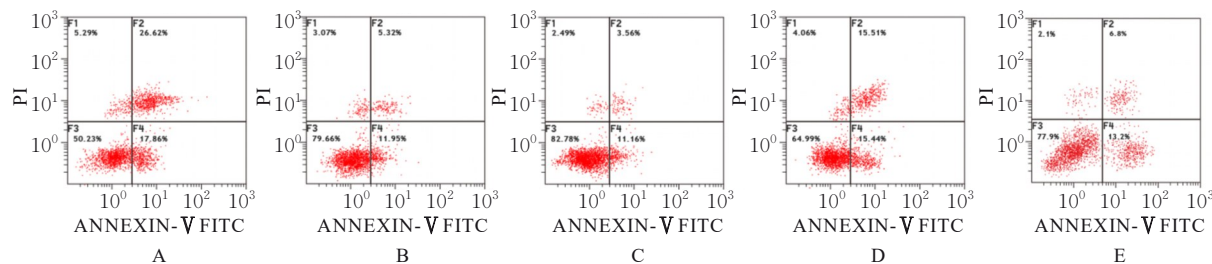
与假手术组比较, 模型组和sh-NC组大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2及p-p38 MAPK/p38 MAPK比值均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组和sh-NC组比较, sh-FV组大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2及p-p38 MAPK/p38 MAPK比值明显降低 ($P < 0.05$); 与sh-FV组比



* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; # $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\circ P < 0.05$ compared with sh-FV group.

图3 各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平

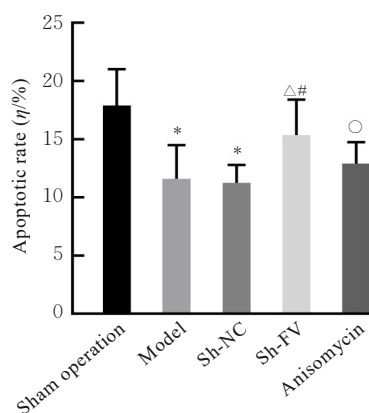
Fig. 3 Levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of rats in various groups



A: Sham operation group; B: Model group; C: Sh-NC group; D: Sh-FV group; E: Anisomycin group.

图4 各组大鼠血液中性粒细胞凋亡情况

Fig. 4 Apoptosis of neutrophils in blood of rats in various groups



* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; # $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\circ P < 0.05$ compared with sh-FV group.

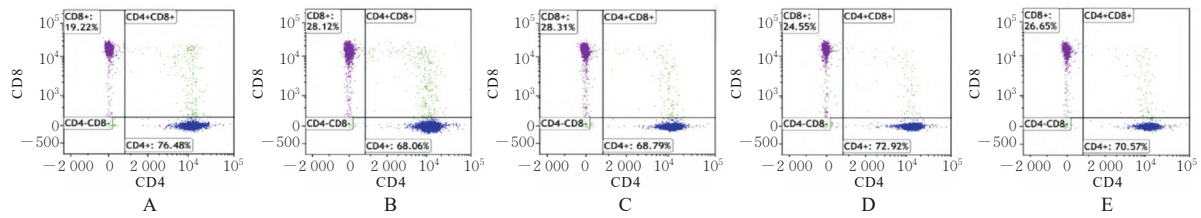
图5 各组大鼠血液中性粒细胞凋亡率

Fig. 5 Apoptotic rates of neutrophils in blood of rats in various groups

较, 茴香霉素组大鼠肺组织中 p-JNK1/2/JNK1/2 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值明显升高 ($P < 0.05$)。见图8。

3 讨论

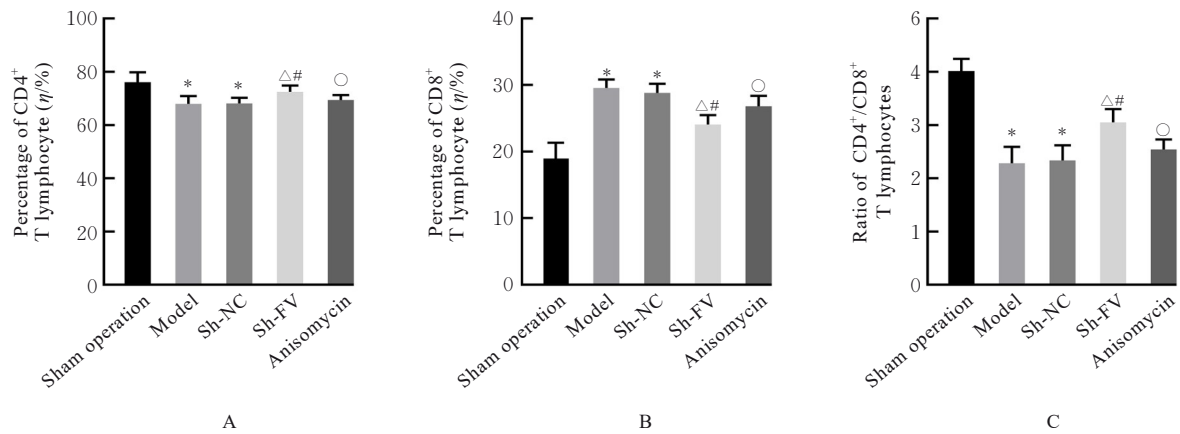
脓毒症是一种高危临床综合征, 特征为宿主对病原体入侵反应失调, 导致严重的器官功能障碍, 然而其机制尚未完全明确。CLP是构建啮齿类动物脓毒症模型的常用方法, 通过人为制造盲肠穿孔, 引发细菌性腹膜炎, 使肠道细菌进入血液循环, 触发全身炎症反应, 模拟临床脓毒症的病理过程^[11]。本研究选用SD大鼠, 采用CLP法建立脓毒症模型。结果显示: 模型组大鼠多脏器受损, HE染色可见炎性细胞广泛浸润。脓毒症期间, 坏死组织和微生物释放的破坏性物质可激活先天免疫系统, 释放大量的TNF- α 和IL-6等促炎细胞因子, 引发“细胞因子风暴”及持续炎症级联反应, 导致组织损伤^[12]。因此, 炎症因子水平不仅反映机体炎症反应程度, 也可作为脓毒症预后评估的重要指标。本研究中, 模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显上调, 进一步证实脓毒症模型的成功构建。



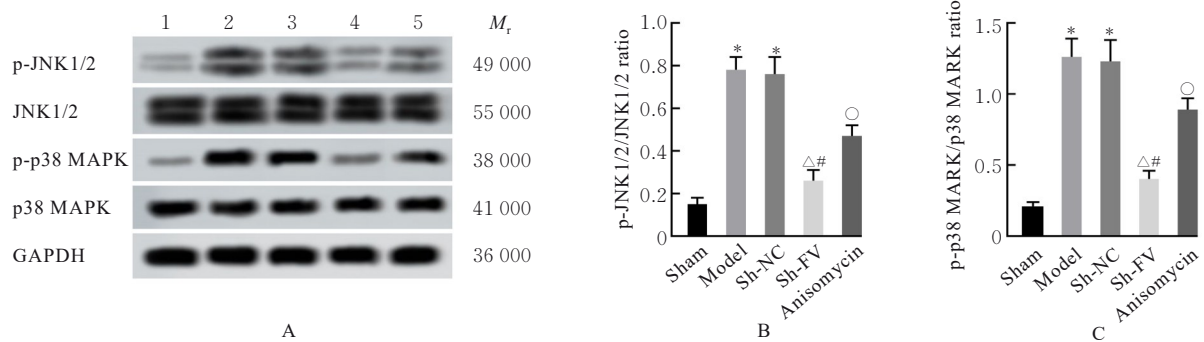
A: Sham operation group; B: Model group; C: Sh-NC group; D: Sh-FV group; E: Anisomycin group.

图6 各组大鼠血液中T淋巴细胞亚群分布情况

Fig. 6 Distribution of T lymphocyte subsets in blood of rats in various groups



* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with model group; $^{\#}P < 0.05$ compared with sh-NC group; $^{\circ}P < 0.05$ compared with sh-FV group.

图7 各组大鼠血液中CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞百分率及CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值Fig. 7 Percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and ratios of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes in blood of rats in various groups

Lane 1: Sham operation group, Lane 2: Model group; Lane 3: Sh-NC group; Lane 4: Sh-FV group; Lane 5: Anisomycin group. B: JNK1/2/JNK1/2 ratio; C: p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio. * $P < 0.05$ compared with sham operation group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with model group; $^{\#}P < 0.05$ compared with sh-NC group; $^{\circ}P < 0.05$ compared with sh-FV group.

图8 各组大鼠肺组织中JNK1/2和p38 MAPK信号通路相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B、C)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathway related proteins in lung tissue of rats in various groups

在脓毒症中, 炎症与凝血相互促进, 形成恶性循环。研究^[13]显示: 炎症损伤内皮细胞, 促使细胞因子表达增加, 进而激活凝血系统, 造成广泛生

理性抗凝系统受损及功能减退, 同时促进纤维蛋白生成及血栓形成。研究^[14]表明: 在脓毒症动物模型中, 凝血酶可通过与巨噬细胞蛋白酶激活受体结

合加剧炎症反应;抑制IL-6或IL-1表达可明显减少凝血酶生成,抑制凝血激活,进而改善病情。因此,抑制凝血酶活性和缓解凝血功能障碍可成为降低脓毒症死亡率的关键策略。FV是凝血因子X的辅助因子,二者结合可形成凝血酶原复合物,将凝血酶原裂解为凝血酶,在凝血级联中起关键作用^[15]。本研究以脓毒症大鼠为模型,通过下调FV表达系统探究其作用机制,结果显示:与模型组比较,sh-FV组大鼠存活率明显升高,其肺、肝、脾和肾脏组织损伤及炎性浸润减轻,血清中炎症因子水平明显降低。这一结果与前述研究在炎症与凝血交互作用方面的发现一致,进一步证实了FV在脓毒症炎症-凝血级联反应中的核心地位。

中性粒细胞是免疫系统抵御感染的第一道防线,其产生于骨髓,后广泛释放至循环中,构成先天免疫的基本组成部分。脓毒症中,中性粒细胞凋亡延迟,导致未成熟中性粒细胞数量增加,进而引发免疫功能障碍和持续炎症,此状态即使在症状缓解后仍可持续存在^[16]。抑制中性粒细胞凋亡可能对宿主免疫系统产生不利影响,加剧组织浸润导致的器官功能损害,并加速脓毒症相关免疫抑制的进程。本研究结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠血清中性粒细胞凋亡率明显降低,这与LUO等^[17]的发现高度一致,证实脓毒症大鼠体内中性粒细胞凋亡存在延迟现象。这一病理变化可能通过延长未成熟中性粒细胞存活时间,持续释放炎症介质,从而加剧免疫紊乱与组织损伤。一项基因富集分析^[18]显示:FV参与调控中性粒细胞活化、免疫应答及炎症反应的关键信号通路。然而,脓毒症背景下FV与中性粒细胞凋亡的直接作用机制尚未阐明。本研究进一步探讨了FV对脓毒症中性粒细胞凋亡的调控作用,结果显示:敲低FV基因后,sh-FV组大鼠血液中中性粒细胞凋亡率明显升高。这一发现提示:FV可能通过调控中性粒细胞凋亡进程参与脓毒症免疫病理反应。

免疫抑制是导致脓毒症患者对原发性和继发性感染易感性增加的重要原因。细胞免疫功能受损会削弱机体抵抗感染的能力,主要表现为T淋巴细胞数量减少和功能减退。CD4⁺T淋巴细胞在脓毒症免疫应答中起关键作用,可激活CD8⁺T淋巴细胞,促进B细胞反应中的免疫球蛋白类别转换,并通过分泌细胞因子参与免疫炎症反应调节。研究^[11]显示:脓毒症期间CD4⁺T淋巴细胞凋亡明显增加,

与患者生存率呈负相关。CD8⁺T淋巴细胞则负责清除感染,产生记忆细胞。在细胞因子和共刺激分子的作用下,结合同源抗原的CD8⁺T淋巴细胞可激发其细胞毒性功能,导致细胞快速增殖,分化为效应细胞,通过释放TNF- α 和IFN- γ 等发挥免疫抑制作用^[19]。本研究分析脓毒症大鼠T淋巴细胞亚群变化,结果显示:与假手术组比较,模型组脓毒症大鼠血清CD4⁺T淋巴细胞百分率和CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值明显降低,而CD8⁺T淋巴细胞百分率明显升高,与既往研究^[20]结果一致。这一变化提示脓毒症发生后大鼠出现明显的免疫抑制,CD4⁺T淋巴细胞减少和CD8⁺T淋巴细胞过度活化可能共同导致免疫功能紊乱。FV来源的调节肽作为CD4⁺T淋巴细胞效应反应的有效抑制剂,具有体内外免疫调节作用^[21]。本研究结果显示:下调FV基因表达后,sh-FV组脓毒症大鼠CD4⁺T淋巴细胞百分率和CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值明显升高,CD8⁺T淋巴细胞百分率明显降低,T淋巴细胞异常凋亡得到逆转。这一结果提示,下调FV基因表达可能通过减少CD4⁺T淋巴细胞凋亡和调节CD8⁺T淋巴细胞功能,改善脓毒症大鼠的免疫抑制状态。

研究^[22]表明:脓毒症引发的全身性炎症反应综合征包括炎症细胞因子和炎症信号通路的广泛激活。其中,MAPK信号通路,尤其是p38 MAPK和JNK1/2,作为细胞增殖与存活的关键调控因子,可被多种炎症介质和环境刺激激活,是脓毒症治疗的重要靶点^[23]。研究^[24]显示:在CLP诱导的脓毒症模型中,JNK和p38 MAPK表达水平明显上调,进而加剧炎症介质释放和细胞死亡,导致组织损伤。因此,阻断这些信号通路的激活是治疗败血症的关键策略。ZHANG等^[25]研究显示:抑制JNK/p38 MAPK轴可减少炎症、氧化应激和细胞凋亡,减轻脓毒症急性肾损伤。CUI等^[26]研究表明:抑制p38 MAPK和JNK的磷酸化,可通过抗凋亡、抗炎和促自噬作用改善脓毒症诱导的心肌损伤。另有研究^[27]表明:p38 MAPK和JNK通路激活不仅抑制中性粒细胞延迟凋亡,促进其组织浸润,还可能影响胸腺细胞发育,干扰CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞稳态。然而,目前关于FV对p38 MAPK和JNK通路起直接调控作用的研究仍存在空白。本研究结果显示:模型组脓毒症大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2和p-p38 MAPK/p38 MAPK比

值明显升高, 这进一步支持了MAPK信号通路在脓毒症炎症反应中的核心作用; 下调FV表达的sh-FV组大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2和p-p38 MAPK/p38 MAPK比值明显降低; 与sh-FV组比较, 茴香霉素组大鼠肺组织中p-JNK1/2/JNK1/2和p-p38 MAPK/p38 MAPK比值明显升高。上述结果提示: 下调FV基因表达可能通过抑制JNK1/2和p38 MAPK通路的磷酸化, 调节中性粒细胞和T淋巴细胞亚群, 从而改善脓毒症大鼠炎症反应。

综上所述, 沉默FV基因可减轻脓毒症大鼠多器官组织损伤, 诱导血液中性粒细胞凋亡, 降低血清中炎症因子水平, 提高血液中CD4⁺ T淋巴细胞百分率和CD4⁺/CD8⁺ T淋巴细胞比值, 其机制可能与抑制JNK1/2和p38 MAPK信号通路有关。本研究为脓毒症提供了新的治疗靶点, 未来研究仍需进一步探讨其对下游靶基因的调控作用及其他信号通路的相互作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王镜媛参与实验设计、论文撰写和修改, 陈芳和刘艳存参与数据获取及分析, 李士欣和寿松涛参与实验设计及论文审阅。

[参考文献]

- [1] SRZIC I, NESEK ADAM V, TUNJIC PEJAK D. Sepsis definition: what's new in the treatment guidelines[J]. Acta Clin Croat, 2022, 61(Suppl 1): 67-72.
- [2] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-211.
- [3] WANG B B, ZHU L L, JIA B, et al. Sepsis induces non-classic innate immune memory in granulocytes[J]. Cell Rep, 2023, 42(9): 113044.
- [4] UNAR A, BERTOLINO L, PATAUNER F, et al. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis: A clinically focused overview[J]. Cells, 2023, 12(17): 2120.
- [5] LIND S M, SLETTEN M, HELLENES M, et al. Coagulation factor V in breast cancer: A p53-regulated tumor suppressor and predictive marker for treatment response to chemotherapy [J]. J Thromb Haemost, 2024, 22(6): 1569-1582.
- [6] 文柯力. 脓毒症合并弥散性血管内凝血的机制及抗凝治疗研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(9): 1370-1374.
- [7] 张 铭, 雷 娇, 龚 禹, 等. 芍药苷通过JNK/NEK7/NLRP3通路缓解脓毒症相关急性肾损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(9): 1711-1717.
- [8] ZHANG Y R, CHEN Z R, GUO J Y, et al. Factor XII and prekallikrein promote microvascular inflammation and psoriasis in mice[J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(19): 3760-3778.
- [9] 沈 磊, 董 林, 贺福义, 等. 三七总皂苷调节RAGE/MAPK/NF-κB信号通路对糖尿病骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(23): 5768-5772.
- [10] 温 亚, 李 燕, 白思怡, 等. 瑞香素调节STING/TBK1/IRF3信号通路对脓毒症大鼠免疫炎症反应的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2024, 45(5): 822-827.
- [11] ZENG Y C, CAO G D, LIN L, et al. Resveratrol attenuates sepsis-induced cardiomyopathy in rats through anti-ferroptosis via the Sirt1/Nrf2 pathway[J]. J Invest Surg, 2023, 36(1): 2157521.
- [12] NEDEVA C. Inflammation and cell death of the innate and adaptive immune system during sepsis [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 1011.
- [13] CHEN W J, PAN J Y. Anatomical and pathological observation and analysis of SARS and COVID-19: Microthrombosis is the main cause of death [J]. Biol Proced Online, 2021, 23(1): 4.
- [14] FANG Z D, ZHANG X W, HUANG Y Y, et al. Piperlongumin improves survival in the mouse model of sepsis: Effect on coagulation factors and lung inflammation[J]. Inflammation, 2022, 45(6): 2513-2528.
- [15] MOHAMMED B M, PELC L A, RAU M J, et al. Cryo-EM structure of coagulation factor V short [J]. Blood, 2023, 141(26): 3215-3225.
- [16] XUAN W X, WU X, ZHENG L C, et al. Gut microbiota-derived acetic acids promoted sepsis-induced acute respiratory distress syndrome by delaying neutrophil apoptosis through FABP4[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 438.
- [17] 罗玉娇, 郑小莉, 罗 波, 等. PD-L1通过调控PKC-α-NF-κB信号通路延迟脓毒血症中性粒细胞凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(17): 2049-2052.
- [18] GENDRE B, MARTINEZ-PEREZ A, KLEBER M E, et al. Genome-wide search for nonadditive allele effects identifies PSKH2 as involved in the variability of factor

- V activity[J]. *J Am Heart Assoc*, 2024, 13(21): e034943.
- [19] 郑涵雪, 张连生, 李莉娟. 微移植治疗急性髓系白血病不同预处理方案精细免疫指标的差异性研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2025, 45(1): 54-61.
- [20] 谢小丽, 张予晋, 谭 瑶, 等. JAK/STAT通路介导免疫缺陷大鼠CD4⁺T细胞分化的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(7): 1206-1214.
- [21] DE GROOT A S, ROSENBERG A S, SHAHJAHAN MIAH S M, et al. Identification of a potent regulatory T cell epitope in factor V that modulates CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell responses[J]. *Clin Immunol*, 2021, 224: 108661.
- [22] 王 静, 辛绍斌. 脓毒症亚型的研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2025, 45(9): 785-792.
- [23] FAWZY M A, MAHER S A, BAKKAR S M, et al. Pantoprazole attenuates MAPK (ERK1/2, JNK, p38)-NF- κ B and apoptosis signaling pathways after renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10669.
- [24] MOHYELDIN R H, ALAAELDIN R, SHARATA E E, et al. LCZ696 attenuates sepsis-induced liver dysfunction in rats; the role of oxidative stress, apoptosis, and JNK1/2-P38 signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2023, 334: 122210.
- [25] ZHANG W, CHEN H Z, XU Z Y, et al. Liensinine pretreatment reduces inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy to alleviate sepsis acute kidney injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110563.
- [26] CUI Y N, TIAN N, LUO Y H, et al. High-dose Vitamin C injection ameliorates against sepsis-induced myocardial injury by anti-apoptosis, anti-inflammatory and pro-autophagy through regulating MAPK, NF- κ B and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in rats [J]. *Aging*, 2024, 16(8): 6937-6953.
- [27] ISHIKURA S, OGAWA M, DOI K, et al. Zfat-deficient CD4⁺ CD8⁺ double-positive thymocytes are susceptible to apoptosis with deregulated activation of p38 and JNK[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(1): 149-157.