



北京大学

硕士研究生学位论文

题目： CMTM4 在脓毒症 T 细胞中的表达
与功能及淋巴细胞相关比值预
测脓毒症心肌损伤的临床价值

姓 名：	王雅心
学 号：	1811210449
院 系：	第二临床医学院
专 业：	重症医学
研究方向：	脓毒症基础与临床研究
导师姓名：	朱凤雪 教授

二〇二一年六月

版权声明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人，未经本论文作者同意，不得将本论文转借他人，亦不得随意复制、抄录、拍照或以任何方式传播。否则，引起有碍作者著作权之问题，将可能承担法律责任。

摘要

第一部分 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达及功能研究

目的 抗炎/促炎失衡、免疫功能紊乱是脓毒症重要发病机制，适应性免疫系统缺陷、免疫抑制是患者预后差的主要原因，为探究脓毒症免疫机制的重中之重。脓毒症适应性免疫缺陷的主要特征是 T 淋巴细胞受损、耗竭，表现为细胞数量减少、凋亡增加、功能减弱。已有研究证明趋化素样因子超家族成员 CMTM4 在肿瘤疾病中与负性调控因子存在相互作用，负向调节 T 细胞功能致肿瘤免疫逃逸，但目前尚无任何有关 CMTM4 在脓毒症中的研究。本研究^①将探索 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达水平及对脓毒症 T 细胞免疫功能的影响，为今后研究人员探究脓毒症免疫发病机制抛砖引玉，为脓毒症临床诊治提供新思路。

方法 (1) 根据 2016 年脓毒症指南 Sepsis 3.0 诊断脓症患者，抽取患者确诊时的外周血，记录血常规及炎症因子检查结果，同时采集健康志愿者外周血，利用淋巴细胞分离液体外分离人外周血淋巴细胞，CD3⁺磁珠分选 T 淋巴细胞；RT-qPCR 检测正常组与脓毒症组 CMTM4 基因水平表达差异；Western Blot 检测 CMTM4 蛋白水平差异。

(2) 体外培养人急性 T 细胞白血病 Jurkat 细胞系，给予 LPS 刺激制备脓毒症细胞模型，RT-qPCR 和 Western Blot 检测实验组与对照组基因表达差异。(3) 小干扰 RNA 沉默 Jurkat 细胞 CMTM4 基因，给予沉默组和对照组细胞 LPS 刺激后，CCK-8 法检测两组细胞增殖情况；PI 法检测 CMTM4 对 T 细胞周期的影响；Annexin V-FITC 法对比 LPS 处理后沉默组与对照组凋亡比例，判断 CMTM4 对凋亡的影响；ELISA 法检测 IL-2 与 IL-10 水平变化。(4) CLP 法制备脓毒症小鼠模型，设置 CLP 组与假手术组，于 6h、12h、24h 处死，取小鼠外周免疫器官脾、腹腔淋巴结标本，RT-qPCR 和 Western Blot 检测 CLP 组与假手术组 CMTM4 表达差异，免疫组化观察 CMTM4 在组织中的表达情况。

结果 (1) 与健康志愿者相比，CMTM4 在脓症患者外周血 T 淋巴细胞中基因和蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。(2) LPS 刺激 Jurkat 细胞得到的脓毒症细胞模型与空白对照组相比，CMTM4 在 RNA 和蛋白水平表达均升高 ($P < 0.05$)。(3) siRNAs 沉默 Jurkat 细胞 CMTM4 基因后再给予 si-CMTM4 组和 si-NC 组两组细胞 LPS 刺激 6h、12h、24h，探究 CMTM4 对脓毒症 T 细胞功能的影响，发现 si-CMTM4 组细胞增殖功能强于 si-NC 组，si-CMTM4 组细胞进入生长周期 S 期的比例明显高于 si-NC 组，si-NC 组细胞停滞于 G1 期的比例高于 si-CMTM4 组 ($P < 0.05$)；si-CMTM4 组经过 LPS 刺激

① 本研究得到国家自然科学基金资助项目 (No. 81971808) 资助。

后,发生凋亡的比例明显低于 si-NC 组 ($P<0.05$),细胞存活比例更高;另外, si-CMTM4 组细胞上清中 IL-2 与 IL-10 浓度均高于 si-NC 组 ($P<0.05$)。(4) CLP 小鼠模型实验中,与假手术组相比,脾、腹腔淋巴结组织 CMTM4 表达量在 RNA 和蛋白水平上均有所升高 ($P<0.05$),形态学上免疫组化结果显示组织内 CMTM4 含量增高。

结论 (1) 人趋化素样因子超家族成员 CMTM4 在脓毒症外周血 T 淋巴细胞中表达增强。(2) CMTM4 在脓毒症小鼠外周免疫器官中表达升高。(3) CMTM4 对脓毒症 T 细胞具有免疫抑制作用,具体表现为抑制 T 细胞增殖能力、影响细胞周期、促进细胞凋亡、抑制 T 细胞分泌炎症因子。因此,我们认为 CMTM4 干预 T 淋巴细胞生物学功能,参与脓毒症免疫紊乱机制, CMTM4 高表达导致 T 细胞免疫功能受抑制,抑制机体获得性免疫功能。

关键词: 脓毒症, T 淋巴细胞, CMTM4, 免疫抑制, 凋亡

第二部分 淋巴细胞相关比值 NLR、PLR 预测脓毒症心肌损伤的临床价值

目的 Sepsis 3.0 指出脓毒症是机体对感染失调导致的威胁生命的器官功能障碍,强调免疫紊乱和器官损伤在疾病中的重要地位,其中获得性免疫是重中之重,具有复杂亚群的淋巴细胞既参与免疫活化又参与免疫抑制,不仅影响免疫状态,亦参与器官损伤的发生,如何将机体免疫与器官损伤相关指标相联合以提高预测效能已为众多研究者所关注。研究涉及的淋巴细胞相关指标——中性粒细胞/淋巴细胞比值 (neutrophil/lymphocyte ratio, NLR)、血小板/淋巴细胞比值 (platelet/lymphocyte ratio, PLR) 把参与脓毒症的重要炎症细胞中性粒细胞、淋巴细胞和血小板相结合,反映免疫/免疫、免疫/凝血间关系,本研究围绕脓毒症心肌损伤探索免疫指标 NLR、PLR 值是否对脓毒症造成的靶器官损害具有诊断及预测价值,希望供临床识别脓毒症心肌损伤所借鉴。

方法 连续纳入 2017-1 至 2019-8 收治于北京大学人民医院 ICU 病房的 142 例脓毒症患者,进行回顾性队列研究。记录患者一般资料和既往史,采集脓毒症时血常规指标 (NEU, LYM, PLT) 计算 NLR、PLR 值; CRP; 入 ICU 24h 内 APACHE II 评分及心肌酶谱。根据 cTnI 值将患者分为两组——非心肌损伤组 74 例和心肌损伤组 68 例;独立样本 t 检验分析两组间差异; Spearman 法判断 NLR、PLR 值与心肌损伤标志物相关性; Logistic 回归法分析脓毒症患者发生心肌损伤的独立危险因素; ROC 曲线评估 NLR、PLR 值对脓毒症患者心肌损伤的预测价值。

结果 心肌损伤组 NLR 值与正常组相比明显增高, PLR 降低 ($P<0.05$)。Spearman 相关分析示脓毒症患者 NLR 与 CRP 呈正相关 ($r=0.604, P<0.05$), PLR 与 BNP 呈负相关 ($r=-0.884, P<0.05$)。Logistic 回归结果示 NLR、PLR 与 BNP 均为脓毒症患者心肌损伤的独立危险因素 ($P<0.05$)。ROC 曲线结果示 NLR、PLR 对应的 AUC 分别为 0.799、0.750,两者对脓毒症患者心肌损伤均有一定预测价值 ($P<0.001$)。

结论 NLR、PLR 对脓毒症患者发生心肌损伤均有一定预测价值，其中 NLR 预测价值更大。

关键词：脓毒症，中性粒细胞/淋巴细胞比值，血小板/淋巴细胞比值，心肌损伤

The Study on Expression and Function of CMTM4 in Septic T Lymphocytes and the Predictive Value of NLR, PLR for Myocardial Injuries in Sepsis

ABSTRACT

Part 1 The study on expression and function of CMTM4 in septic T lymphocytes

Objective

Anti-inflammatory/pro-inflammatory imbalance and immune dysfunction are important pathogenesis of sepsis. The persistent adaptive immune system deficiency, immunosuppression, and immune paralysis during the inflammatory process are the main reasons for the poor prognosis of patients with sepsis, and exploring the immune mechanism of sepsis has become a top priority. The main characteristic of sepsis-adaptive immune system deficiency is damage and exhaustion of T lymphocytes, which are manifested as decreased cell number, increased apoptosis, and weakened function. Studies have shown that CMTM4, a member of the human chemokine-like factor superfamily, interacts with negative regulatory factors in tumor, negatively regulates T cell function, and leads to tumor immune escape. However, there is no relevant study about CMTM4 in sepsis. This study intends to explore the expression level of CMTM4, in septic T lymphocytes and its biologic influence on the immune function of septic T cells, so as to pave the way for future researchers to explore the immune pathogenesis of sepsis and hope to provide noval ideas for the clinical diagnosis and treatment of sepsis.

Methods

(1) Adopt the latest version of the guidelines *Sepsis 3.0* issued in 2016 as the diagnostic criteria to enroll patients with sepsis, collect their peripheral blood, and collect the peripheral blood from healthy volunteers at the same time, use the lymphocyte separation liquid to separate human peripheral blood lymphocytes, Peripheral blood T lymphocytes were sorted by CD3⁺ magnetic beads; the difference of CMTM4 genetic expression between the normal group and the sepsis group was detected by RT-qPCR; the difference in protein level between the two groups was detected by Western Blot. (2) The human acute T-cell leukemia Jurkat cell line was cultured in vitro, and LPS was given to stimulate the septic cellular model. RT-qPCR and Western Blot were used to detect the difference in gene expression between the experimental group and the control group. (3) Use small interfering RNAs (siRNAs) to silence the CMTM4 gene of the Jurkat cell line. After LPS stimulation was

given to the silenced group and the control group, CCK-8 test was used to detect the cell proliferation of the two groups; PI was used to detect the effect of CMTM4 on cell cycle; Annexin V-FITC compares the apoptosis ratio of the silent group after LPS treatment and the control group to determine the effect of CMTM4 on the apoptosis of septic T lymphocytes; ELISA was used to detect IL-2, IL-10 to explore the secretion function changes of septic T lymphocytes treated with siRNAs. (4) Cecal ligation and puncture method to establish a mouse model of sepsis. CLP group and sham group were set up and sacrificed at 6h, 12h, and 24h. The peripheral immune organs of mice were collected. The expression of CMTM4 in the CLP group and the sham group was detected at the transcription and translation level, and the expression of CMTM4 in the tissues was observed by immunohistochemistry.

Results

(1) Compared with healthy volunteers, the expression of CMTM4 in peripheral blood T lymphocytes of patients with sepsis was significantly higher at both transcription and translation levels ($P<0.05$). (2) Compared with the blank control group, the sepsis T cell showed increased expression of CMTM4 after LPS stimulation at the RNA and protein levels ($P<0.05$). (3) After silencing the CMTM4 gene of Jurkat cells with siRNAs, the two groups of cells in the si-CMTM4 and si-NC groups were given LPS stimulation for 6h, 12h, and 24h to explore the effect of CMTM4 on the function of septic T lymphocytes, and found that the cell proliferation function of the si-CMTM4 group was stronger than that of the si-NC group. The proportion of cells in the si-CMTM4 group entering the S phase of the cell cycle was significantly higher than that of the si-NC group, and the proportion of cells stagnating in the G1 phase of the si-NC group was higher than that of the si-CMTM4 group ($P<0.05$). After LPS stimulation, the proportion of apoptosis in the si-CMTM4 group was significantly lower than that of the si-NC group ($P<0.05$), and the proportion of survival cell was higher. In addition, the concentrations of IL-2 and IL-10 in the cell supernatant of the si-CMTM4 group were higher than those of the si-NC group ($P<0.05$). (4) In the CLP mice model, compared with the sham group, the expression of CMTM4 in the peripheral immune organs spleen and abdominal lymph node tissues increased at the RNA and protein levels ($P<0.05$). Morphologically, the results of immunohistochemistry showed that the expression level of CMTM4 in the tissues was increased.

Conclusion

(1) CMTM4, a member of the human chemokine-like factor superfamily, has increased expression in septic T lymphocytes. (2) CMTM4 has an immunosuppressive effect on septic

T lymphocytes, which is specifically manifested as inhibiting the proliferation of T cells, affecting the cell cycle, promoting the occurrence of apoptosis, and inhibiting the secretion of inflammatory cytokines by T lymphocytes. (3) The expression of CMTM4 is elevated in the peripheral immune organs of septic mice. Therefore, we believe that CMTM4 participates in the occurrence of sepsis immunosuppression by interfering with the biological functions of T lymphocytes, and has a certain impact on the immune pathogenesis of sepsis. The increased expression of CMTM4 in sepsis patients leads to suppression of T cell immune function and poor prognosis.

KEY WORDS: Sepsis, T lymphocytes, CMTM4, Immunosuppression, Apoptosis

Part 2 The Predictive Value of NLR, PLR for Myocardial Injuries in Sepsis

Objective

Sepsis 3.0 pointed out that sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by the body's disorder of infection, and emphasizes the important role of immune system disorders and organ damage in the disease. Among them, acquired immunity is the top priority. Lymphocytes with complex subgroups not only affect the immune state, but also participate in the occurrence of organ damage. The role of lymphocytes in septic organ damage has been concerned by many researchers. The first part of this study is about basic experiments on septic T lymphocyte, and the second part will analyze the role of lymphocytes in septic organ damage through clinical patient data. Lymphocyte-related indicators involved in the study---neutrophil/ lymphocyte ratio (NLR) and platelet/ lymphocyte ratio (PLR)---combine the important inflammatory cells involved in sepsis, neutrophils, lymphocytes and platelets, and represents the relationship between immunity/immunity and immunity/coagulation in sepsis. Past studys show that these two indicators can reflects the severity of inflammation to a certain extent, and has gradually become a new biomarker of certain inflammatory diseases. This study focuses on septic myocardial injury to explore whether the index of NLR and PLR have predictive value for target organ damage caused by sepsis. It is hoped that it can be used as a reference for clinical identification of septic myocardial injury.

Methods

This study successively and retrospectively recruited 142 patients with sepsis who were admitted to the ICU of Peking University People's Hospital from January 2017 to August 2019. The demographic and comorbidities were recorded, including neutrophil count, lymphocytes count, and platelet count, were collected when sepsis was diagnosed to calculate NLR and PLR; CRP, myocardial injury indicators (cTnI, BNP, CK-MB,

myoglobin) and APACHE II score within 24 hours of ICU admission were collected. According to the value of cTnI (cardiac troponin), sepsis cases were divided into two groups-non-myocardial injury group (n=74) and myocardial injury group (n=68); independent sample *t*-test analysis was used to analyze differences between the two groups; Spearman analysis was used to judge the correlation between NLR, PLR and myocardial injury indicators; Logistic regression analysis was used to detect the independent risk factors of myocardial injury in patients with sepsis; Receiver operating characteristic (ROC) curves was used to evaluate the value of NLR and PLR on predicting myocardial injury in patients with sepsis.

Results

The NLR value of the myocardial injury group was significantly higher than that of the non-myocardial injury group, and the PLR was lowered ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that NLR and CRP were positively correlated in patients with sepsis($r=0.604, P<0.05$), and PLR was negatively correlated with BNP ($r= -0.884, P<0.05$). Logistic regression results showed that NLR, PLR and APACHE II scores were independent risk factors of myocardial injury in patients with sepsis ($P<0.05$). ROC curve results show that NLR and PLR have a certain predictive value for myocardial injury in patients with sepsis ($P<0.001$).

Conclusion

NLR and PLR have a certain predictive value for myocardial injury in patients with sepsis, and NLR has a greater predictive value.

KEY WORDS: Sepsis, Myocardial injury, Neutrophil/ lymphocyte ratio, Platelet/ lymphocyte ratio

目录

第一章 文献综述.....	1
1.1 T淋巴细胞对脓毒症免疫作用的研究进展.....	1
1.1.1 脓毒症免疫病理机制.....	1
1.1.2 T淋巴细胞在脓毒症免疫机制中的作用.....	2
1.1.3 总结与展望.....	3
1.2 CMTM4 在疾病中对细胞功能调控的研究进展.....	3
1.2.1 CMTM4 的结构特征.....	4
1.2.2 影响细胞增殖与细胞周期.....	6
1.2.3 影响细胞迁移与侵袭能力.....	6
1.2.4 影响细胞凋亡.....	7
1.2.5 影响细胞间连接.....	8
1.2.6 其他.....	8
1.2.7 总结与展望.....	8
第二章 引言.....	10
2.1 立题依据及研究背景.....	10
2.2 研究方法与实验技术.....	11
2.3 研究目标与预期结果.....	12
2.4 拟解决的关键科学问题.....	13
第三章 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达及功能研究.....	14
3.1 实验材料.....	14
3.1.1 主要试剂和材料.....	14
3.1.2 主要仪器.....	15
3.1.3 实验标本.....	16
3.2 实验方法.....	17
3.2.1 人外周血 T 淋巴细胞的分离.....	17
3.2.2 T 淋巴细胞系的培养及体外脓毒症细胞模型的构建.....	18
3.2.3 Trizol 法提取细胞总 RNA 与逆转录合成 cDNA.....	18
3.2.4 RT-qPCR 检测 T 淋巴细胞 CMTM4 基因表达.....	19
3.2.5 Western Blot 检测 T 淋巴细胞 CMTM4 蛋白表达.....	20
3.2.6 小干扰 RNA 敲减 T 淋巴细胞细胞 CMTM4 基因.....	20

3.2.7 CCK-8 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞增殖功能的影响.....	21
3.2.8 PI 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞细胞周期的影响.....	21
3.2.9 Annexin V-FITC 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞凋亡的影响.....	21
3.2.10 ELISA 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞分泌功能的影响.....	22
3.3 统计学方法.....	22
3.4 实验结果.....	22
3.4.1 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达情况.....	22
3.4.2 CMTM4 对脓毒症 T 淋巴细胞功能的影响.....	25
3.5 讨论.....	32
3.6 结论与展望.....	34
第四章 CMTM4 在脓毒症小鼠免疫器官中的表达.....	35
4.1 实验材料.....	35
4.1.1 主要试剂和材料.....	35
4.1.2 主要仪器.....	36
4.1.3 实验动物及标本.....	37
4.2 实验方法.....	37
4.2.1 小鼠脓毒症模型的构建及标本取材.....	37
4.2.2 Trizol 法提取组织总 RNA 与 cDNA 合成.....	38
4.2.3 RT-qPCR 检测 CMTM4 基因表达.....	38
4.2.4 Western Blot 检测 CMTM4 蛋白表达.....	39
4.2.5 免疫组化检测小鼠免疫器官中 CMTM4 表达量.....	39
4.2.6 ELISA 法检测小鼠血清 IL-6 浓度.....	39
4.3 统计学方法.....	40
4.4 实验结果.....	40
4.4.1 CLP 小鼠脓毒症炎症程度.....	40
4.4.2 脓毒症小鼠外周免疫器官中 CMTM4 表达量升高.....	41
4.5 讨论.....	43
4.6 结论.....	44
第五章 淋巴细胞相关比值 NLR、PLR 预测脓毒症心肌损伤的临床价值.....	45
5.1 研究目的.....	45
5.2 研究方法.....	45
5.2.1 纳入标准与排除标准.....	45
5.2.2 研究指标及实验分组.....	45

5.2.3 统计学方法.....	45
5.3 研究结果.....	46
5.3.1 心肌损伤组与非损伤组患者基线资料对比.....	46
5.3.2 对比 NLR 和 PLR 在心肌损伤组与非损伤组间的差异.....	47
5.3.3 NLR、PLR 值与心肌损伤指标及炎症指标的相关性分析.....	47
5.3.4 Logistic 回归分析脓毒症患者发生心肌损伤的危险因素.....	48
5.3.5 ROC 曲线探究 NLR 和 PLR 对脓毒症心肌损伤的预测价值.....	48
5.4 讨论.....	49
5.5 结论及展望.....	50
参考文献.....	52
致谢.....	58
北京大学学位论文原创性声明和使用授权说明.....	59
个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果.....	60

主要符号对照表

缩略词	英文名称	中文名称
CMTM	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing family	CKLF 样含 MARVEL 穿膜结 构域超家族
CLP	cecal ligation and puncture	盲肠结扎穿孔
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
ICU	intensive care unit	重症监护病房
PRRs	pattern recognition receptors	模式识别受体
PAMPs	pathogen associated molecule patterns	病原体相关分子模式
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子 α
IL-2,6,10	interleukin-2,6,10	白介素-2,白介素-6,白介素-10
LPS	lipopolysaccharid	脂多糖
PD-L1	programmed cell death 1 ligand	程序性细胞死亡配体 1
PD-1	programmed cell death 1	程序性细胞死亡受体 1
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment	序贯性器官衰竭评估
MOF	multiple organ failure	多器官功能衰竭
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
SPF	specific pathogen free	无特定病原体
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
Th	helper T cell	辅助性 T 细胞
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	细胞毒性 T 细胞相关蛋白 4
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附法
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
WB	western blot	蛋白质免疫印迹试验
SIRS	systemic inflammatory response syndrome	全身炎症反应综合征
NLR	neutrophil/ lymphocyte ratio	中性粒细胞/淋巴细胞比值
PLR	platelet/ lymphocyte ratio	血小板/淋巴细胞比值
APACHE II	acute physiology and chronic health evaluation II	急性生理与慢性健康状况评 分系统 II
TLRs	Toll like receptors	Toll 样受体
APCs	antigen presenting cells	抗原呈递细胞
Treg	T regulatory cell	调节性 T 细胞
Teff	effector T cell	效应性 T 细胞
CARS	counter-anti-inflammatory response syndrome	代偿性抗炎反应综合征

缩略词	英文名称	中文名称
NEU	neutrophil count	中性粒细胞计数
LYM	lymphocyte count	淋巴细胞计数
PLT	platelet count	血小板计数
cTnI	cardiac troponin,	肌钙蛋白 I
ROC	receiver operating characteristic curve	受试者工作特征曲线

第一章 文献综述

1.1 T 淋巴细胞对脓毒症免疫作用的研究进展

最新版脓毒症指南 Sepsis 3.0 将脓毒症定义为机体对感染反应失调而导致的致死性器官功能障碍^[1], 是重症患者死亡的主要原因。从 Fleischmann 团队研究结果来看^[2], 脓症患者院内死亡率为 17%, 全球范围内每年有 530 多万人死于脓毒症; 2020 年 Rudd 等人^[3]在《柳叶刀》上发布了目前全球脓毒症患病情况, 统计数据显示 2017 年全球约 4890 万脓症患者, 其中约 1100 万死于脓毒症, 该数据是 2016 年 Fleischmann 团队结果的 1.6 倍, 可见脓毒症一直给世界公共卫生事业和医疗资源分配带来不小的负担。但由于其发病过程涉及炎症爆发、免疫紊乱、凝血障碍、器官损伤等全身各系统多个方面, 发病机制错综复杂, 目前尚未对其有充分的理解, 对脓毒症发病机制的研究仍然是脓毒症领域内临床与基础研究的难点和热点。其中免疫和炎症机制是参与脓毒症发生发展的重要方面, 一直为研究者们所关注。

1.1.1 脓毒症免疫病理机制

脓毒症病理生理反应是一种混合性炎症反应过程, 主要包含两种状态——全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)^[4], 促炎/抗炎反应的平衡状态决定机体的免疫状态, 失衡则往往代表着脓症患者病情严重、预后不良, 而炎症依赖并作用于机体免疫系统及其他靶器官组织, 炎症与免疫相辅相成、互为因果, 两者对脓毒症进展的影响可划分三个阶段: ①脓毒症早期为高炎症反应状态, 固有免疫细胞如中性粒细胞、树突状细胞、单核细胞受抗原刺激后过度激活, 释放大量炎症因子, 造成瀑布式级联放大炎症反应, 类似正反馈作用; 同时机体亦有代偿机制, 即启动代偿性抗炎反应抑制过度炎症^[5,6]。②若控制效果不佳则进入脓毒症中期——混合性免疫状态, 促炎与抗炎反应并存, 且抗炎反应趋于增强, 促炎反应趋于减弱, 但这两者之间不是简单的平衡问题, 而是由多种炎症细胞及炎性分子参与、彼此交互作用、竞争与协调并存而形成的复杂网络。此时机体状态存在三类转归: a. 达到免疫平衡, 病情好转; b. 呈多态性混合免疫, 免疫状态偏向较强的一方, 但双方均对机体产生影响, 互相僵持, 病情复杂多变; c. 免疫受损严重, 出现免疫低下进而免疫麻痹, 机体大多继发严重感染而死亡^[7,8]。③若病情继续恶化则进入脓毒症后期免疫抑制状态, 免疫细胞数量锐减、功能严重减弱, 导致免疫麻痹; 此期虽固有免疫和获得性免疫均有参与, 但造成免疫抑制并持续存在的主要是淋巴细胞凋亡^[9,10]。

病原体侵入机体后，固有免疫和适应性免疫均参与到机体的“灭敌”工作中。固有免疫细胞通过模式识别受体（pattern recognition receptors, PRRs）识别外界病原微生物和自身坏死组织表面的病原相关分子模式（pathogen associated molecule patterns, PAMPs），介导炎症反应、启动脓毒症免疫^[11,12]。若免疫细胞过度活化，短时间内大量炎性介质如白细胞介素（interleukin, IL）-1、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）被释放入血，爆发“细胞因子风暴”和“炎症瀑布”，促炎反应虽然有利于致病原的清除，但也对机体自身产生攻击，损伤机体免疫细胞和器官组织细胞，免疫细胞数量减少、功能受抑制，造成机体免疫功能紊乱并发生致命性器官损伤^[13,14]。既往研究提出，早期高炎症状态、晚期免疫抑制是脓毒症死亡率高的主要原因之一；与早期炎症反应相比，绝大多数脓毒症患者死于免疫抑制状态下的继发性感染，由此，免疫功能低下、免疫麻痹是导致脓毒症恶化及患者预后差的关键因素^[15,16]。炎症因子主要攻击适应性免疫细胞，所以脓毒症免疫抑制的重要特征体现在以 T 淋巴细胞异常为主的适应性免疫系统缺陷，表现为：① T 细胞耗竭，包括增殖能力下降和大量凋亡；② 细胞亚群分化失调，向着起着负向调控作用的 Th2 型淋巴细胞优势分化；③ 机会性感染概率增加^[17]。

1.1.2 T 淋巴细胞在脓毒症免疫机制中的作用

免疫动力学失衡造成免疫紊乱是脓毒症发病的特征性机制之一，也是关乎脓毒症患者疾病严重程度和预后的一大重要因素，严重脓毒症患者多因免疫功能障碍发生二次感染而死亡，其中获得性免疫功能受损是免疫紊乱的重要特征，主要体现在 T 细胞耗竭、功能异常，下面将对 T 淋巴细胞在脓毒症免疫机制中的作用做一简要概述。

T 细胞是参与受感染机体适应性免疫应答的关键细胞，受到抗原刺激后的 T 淋巴细胞分化为 CD4⁺辅助性 T 淋巴细胞（helper T cell, Th）及 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL），其中 Th 细胞进一步分化为调节性 T 细胞（T regulatory cells, Tregs）亚群和效应 T 细胞（effector T cells, Teffs）。Teffs 可分化成三类——Th1、Th2 和 Th17 细胞，各自分泌的细胞因子种类不同，Th1 细胞参与获得性免疫中的细胞免疫应答为主，而 Th2 细胞则以促进体液免疫反应为主，Th17 细胞特异性分泌促炎因子 IL-17，促进炎症反应；Tregs 依靠分泌抑制性细胞因子如 IL-10、IL-35 主要发挥负向调控免疫状态的作用，免疫麻痹的发生与 Tregs 密切相关^[18-20]。可见在脓毒症发病过程中，T 淋巴细胞不同亚群各司其职，部分参与促炎反应、部分起到负向调控作用，在维持免疫状态平衡方面意义重大，若 T 细胞受过度炎症反应的攻击导致数量减少、功能异常，机体免疫平衡将被打破，免疫状态向抑制方向转化，CARS 往往反映脓毒症机体免疫抑制状态，判断 CARS 的重要指标之一就是 T 淋巴细胞绝对数减少^[21]，如不及时给予有效干预，最终导致免疫麻痹，预后差^[22]。

那么脓毒症 T 细胞通过什么机制造成免疫抑制呢？目前可以明确的 T 细胞功能异

常主要包括细胞增殖能力下降、凋亡增加以及 CD4⁺T 细胞向 Th2 亚群的优势分化。Th2 主司抑制性细胞免疫反应，下调免疫；另外，T 细胞凋亡在三种机制中占主要地位，在脓毒症病人及脓毒症小鼠模型中均得到验证，凋亡不止发生在外周血 T 细胞上，在脾和淋巴结中同样观察到凋亡的发生^[23,24]。

发生凋亡的途径有两种——固有 (Fas, FasL) 与外源 (TNF)，参与凋亡的分子主要包括细胞毒性 T 细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4)、上调的促凋亡蛋白 Bim 与下调的抗凋亡蛋白 Bcl-2、程序性死亡受体-1/程序性死亡配体-1 (programmed cell death protein-1/ programmed cell death ligand-1, PD-1/PD-L1) 等等^[23,25-27]。在众多分子机制中，以 PD-1/PD-L1 的相互作用为主，作用最明显。PD-1 在严重脓症患者中表达持续上调；PD-L1 持续表达于免疫细胞和组织细胞中，但在炎症刺激下，其在 T 细胞中的表达上调，所以 T 细胞功能受损严重^[28]。在脓毒症死者中检测到 CD4⁺T 细胞 PD-1 表达量增加^[29]；后续研究亦证明 PD-1 表达上调确与 T 细胞增殖能力缺陷、继发感染和院内死亡率具有相关性，是造成 T 细胞耗竭的主要机制^[4,30]。

1.1.3 总结与展望

虽然 T 淋巴细胞不是脓毒症发生初期首当其冲的免疫细胞，但其对于脓毒症中、后期机体免疫状态及对患者病情进展和预后具有重要影响。脓毒症发病过程中大量促炎与抗炎因子对 T 细胞造成损伤，所以在脓毒症初期，T 淋巴细胞已经开始受损，这导致 T 细胞数量减少、功能减弱，逐步发生免疫抑制，若不进行及时有效的治疗，最终将导致免疫麻痹，患者往往因继发严重感染而预后较差。在基础研究向临床应用的转化中，虽然从理论上讲应该针对脓毒症不同免疫阶段给予不同免疫治疗，但目前尚未设立明确的免疫状态划分标准，且免疫机制错综复杂，究竟孰强孰弱、给予什么程度的抗炎和免疫强化治疗，尚无法准确判断，所以对脓毒症免疫发病机制的研究依旧任重而道远。

1.2 CMTM4 在疾病中对细胞功能调控的研究进展

CMTM 家族由北京大学人类疾病基因研究中心韩文玲教授及其团队率先在国际上报道^[31]，该家族又名 CKLF 样含 MARVEL 穿膜结构域超家族 (CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing family, CMTM)，他们将人髓系白血病 U937 细胞系用 PHA 刺激后分离出 CKLF；再利用表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, ESTs) 数据库和生物信息学分析，随后接连发现 CKLFSF1-8，多数成员都包含不同 RNA 剪接体。2005 年国际人类基因命名委员会 (HUGO) 按照编码产物含有的 MARVEL 穿膜

结构域,将 CKLFSF1-8 更名为 CMTM1-8, CMTM4 即为家族成员之一^[32,33]。含 MARVEL 结构域一般代表该蛋白拥有四次跨膜区域,可转运膜蛋白、协调形成细胞间紧密连接。由于近几年肿瘤领域研究进展,发现 CMTM4 在诸多类型肿瘤中表现为抑癌基因,表达水平的变化对肿瘤细胞及肿瘤免疫细胞的生物学功能有影响,遂越来越多的研究团队将关注点投向 CMTM4,想了解其是否可作为潜在的免疫治疗靶点。

1.2.1 CMTM4 的结构特征

CMTM4 位于染色体 16q22.1,分布紧密形成基因簇,既往肿瘤研究中发现该位点附近经常发生基因突变,且证明承载了部分抑癌基因,所以猜测该基因簇与抑癌作用相关^[34-36]。PCR 扩增和测序结果显示 CMTM4 含有 v1、v2、v3 三种剪接体, Northern Blot 实验测得分子大小依次为 1.2、3.4、8.2 kb,对应编码 234、208 和 179 个氨基酸^[31]。细胞系和组织内表达最为广泛的是 v1、v2 剪接体,只在肾和胎盘组织中检测到 v3^[31,37]。CMTM4-v2 是三种剪接体中最稳定、最保守的,它是全长 cDNA 的产物,小鼠体内仅发现 CMTM4-v2,与人-v2 具有 95.7%同源。NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 显示 CMTM4 在甲状腺表达最多,肝、脾、淋巴结和骨髓中表达量最少,几乎不表达(见图 1.1)。由于 CMTM4 剪接体均拥有 MARVEL 结构域,提示可能参与调节跨膜运输与紧密连接形成^[38]。研究发现 CMTM4 属于膜蛋白,分布于细胞质膜、高尔基体膜及胞内囊泡(见图 1.2,引自 The Human Protein Atlas 数据库, <https://www.proteinatlas.org/>),调节包括程序性死亡受体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 和血管内皮钙黏连蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 在内的膜分子运输与稳定性^[39-42],且在某些恶性肿瘤中表现出调节肿瘤细胞和相关免疫细胞生物学行为的作用。

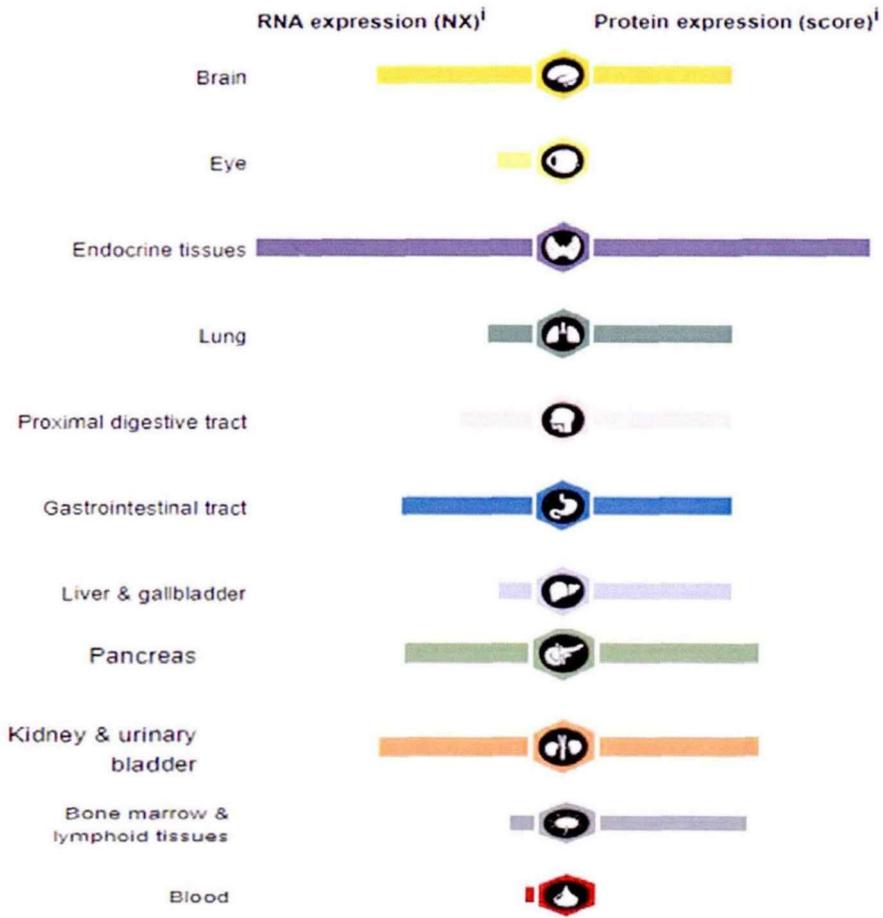


图 1.1 正常人组织细胞中 CMTM4 的 RNA 和蛋白表达情况 (The Human Protein Atlas 数据库, <https://www.proteinatlas.org/>)

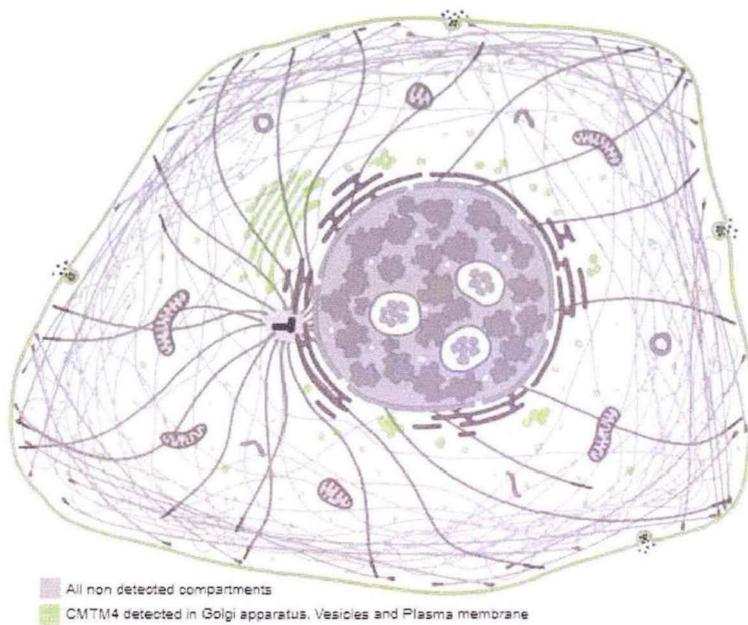


图 1.2 CMTM4 在细胞结构中的定位 (The Human Protein Atlas 数据库, <https://www.proteinatlas.org/>)

1.2.2 影响细胞增殖与细胞周期

CMTM4 的表达水平可影响细胞增殖能力。Kittler 等人从包含 15,497 个人类基因的 cDNA 文库中构建相应的 esiRNA 库(endoribonuclease-prepared short interfering)[43,44], 从中筛出 37 个对 HeLa 细胞增殖分裂有影响的基因, CMTM4 便是其一, 敲低 CMTM4 基因不会终止有丝分裂, 纺锤体形态正常, 亦不会导致细胞死亡, 但导致有丝分裂时胞质分裂异常, 形成双核细胞[45]。Kittler 等并未对其机制进一步探讨。2010 年韩文玲等针对 CMTM4 影响 HeLa 细胞分裂增殖这一结论展开更加深入的研究, 过表达 HeLa 细胞 CMTM4 基因导致活细胞计数、集落形成数目均明显减少。细胞周期是影响细胞增殖的关键机制, 流式细胞技术分析过表达与未经基因编辑的 HeLa 细胞在细胞周期进展上的差异, 发现无论是否预先对周期进行同步化处理, 过表达 CMTM4 均导致细胞大量阻滞于 G2/M 期, 阻止细胞增殖[41]。上述两个团队共同证明 CMTM4 影响 HeLa 细胞增殖与细胞周期。除明确了对 HeLa 细胞有影响以外, 研究者在肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)和结直肠癌(colorectal cancer, CRC)[42]背景下观察 CMTM4 是否对细胞增殖产生差异, 并利用流式检测细胞周期变化。通过上调、下调 CMTM4 在肾透明细胞癌 786-O 和结直肠癌 HT29、SW480 细胞系中的表达, 发现过表达 CMTM4 会抑制其增殖且细胞周期阻滞于 G2/M 期, 这与在 HeLa 细胞上得出的结论一致。

除肿瘤细胞, 荷兰研究团队沉默及过表达人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 细胞系 CMTM4 基因, 发现 CMTM4 表达减低对细胞增殖影响不大, 但过表达导致细胞生长抑制, 细胞周期停滞于 G0/G1 期[39]。这与在肿瘤中的研究结论存在差异, 提示在非肿瘤性疾病中, CMTM4 可能对细胞增殖和细胞周期发挥不完全一致的调节作用, 存在分别研究的必要性。

在机制方面, 目前仅有对 ccRCC 及 CRC 细胞的研究。通过检测 ccRCC 786-O 细胞周期调控的标志物表达水平发现, 无论在基因还是蛋白水平, CMTM4 均上调细胞周期调控基因 p21, 上调的 p21 抑制 Cdk1/CyclinB 复合物对周期的调控作用致 G2/M 期阻滞从而抑制 786-O 细胞增殖; 另外, 对参与调节 CRC 细胞增殖的信号通路进行 Western Blot 检测, 发现高表达 CMTM4 降低了 AKT, ERK1/2, STAT3 通路磷酸化水平, 从而抑制 CRC 细胞生长[42,46]。有趣的是, 在 ccRCC 的 786-O 细胞中作为 p21 上游分子的 p53 未被检测到激活, 所以 CMTM4 是如何上调 p21 的还需进一步研究。

1.2.3 影响细胞迁移与侵袭能力

Bei 等[47]对 CMTM4 与肝细胞肝癌患者的肿瘤临床病理特征进行相关性分析, 结果显示肿瘤大小、淋巴结及远处转移、临床分期都与 CMTM4 表达密切相关。研究者利用划痕实验和 Transwell 实验观察 CMTM4 水平对细胞迁移与侵袭能力的影响, 过表达

CMTM4 后的 ccRCC 786-O 和 CRC SW480 细胞其侵袭和迁移能力显著减弱, 而下调则使 CRC HT29 细胞能力增强。在 ccRCC 中, 高表达的 CMTM4 上调 p21 水平, 通过抑制 Rho GTP 酶及相关信号通路影响细胞迁移; 而在 CRC 中, 抑制作用借助 CMTM4 使 AKT, ERK1/2, STAT3 通路磷酸化水平降低实现, 但其并不一定亦适用于其他肿瘤细胞, 还需大量研究对机制进行探索^[42,46]。与上述研究结论不同的是, Chrif 等利用划痕实验发现在 HUVECs 上过表达 CMTM4 并不对细胞迁移产生影响, 但沉默 CMTM4 导致其迁移能力显著下降^[39]。

1.2.4 影响细胞凋亡

不少研究对基因编辑后的细胞进行了凋亡检测, Han 等先后对 CMTM4 过表达的 HeLa 细胞^[41]、786-O 细胞^[46]和 SW480 细胞^[42]进行 Annexin V 与 PI 染色及流式检测, 均未观察到细胞凋亡的发生, 从现有实验结果看, CMTM4 分子似乎与实体肿瘤细胞凋亡并无太大关系, 并不直接致细胞凋亡。

这是否代表 CMTM4 与凋亡不存在任何联系呢? 并非如此。Zhang 等^[36]在研究 miR-205 (microRNA-205) 对慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 的影响时发现 CMTM4 可使肾细胞发生凋亡。CMTM4 mRNA 的 3'UTR 区域有两个 miR-205 结合位点, 结合后可在转录水平调节 CMTM4 mRNA 活性。在体外对 HK-2 细胞上调 miR-205 表达可保护细胞不发生凋亡, 利用 Western Blot 和双荧光素报告酶基因实验检测过表达 miR-205 的 HK-2 细胞时, 均显示 CMTM4 表达减少。由此得知, miR-205 通过减少 CMTM4 表达量实现对肾细胞凋亡的抑制作用, CMTM4 影响肾细胞凋亡, 高表达的 CMTM4 促进凋亡发生。

此外, Mezzadra 和 Burr 两个团队先后在 Nature 上发表了关于 CMTM 与 PD-L1 蛋白存在相互作用的文章, 其共同证明 CMTM6 是调控 PD-L1 蛋白稳定性与半衰期的关键分子, 而 Mezzadra 发现 CMTM4 作为 CMTM6 的替代分子, 与 CMTM6 具有相同的功能, 备用调控及保护 PD-L1^[40,48]。Mezzadra 团队敲低 12 种肿瘤细胞系模型 CMTM6 基因, 结果示无论是细胞固有表达的 PD-L1 还是受 IFN- γ 诱导产生的 PD-L1, 其蛋白水平均有 2 倍到 10 倍不同程度降低; 此外在免疫方面, 在抗原呈递细胞如树突状细胞上亦是如此。CMTM4 与 6 有 55% 同源性, 和 PD-L1 共表达于肿瘤细胞和抗原呈递细胞膜上, 两种基因不影响 PD-L1 转录水平, 而是影响从内质网运输出的蛋白活性、在翻译水平进行保护, 防止其被泛素化降解、延长半衰期, 从而增加 PD-L1 在肿瘤细胞和抗原呈递细胞膜上的蛋白水平, 该调控作用不借助 IFN γ R 介导的信号通路, 亦不影响 MHC-I 和 PD-L2 水平。上调的 PD-L1 与更多的 T 淋巴细胞膜上 PD-1 结合, 负向调控 T 细胞功能, T 细胞增殖减少、凋亡增多, 导致肿瘤免疫逃逸。当然, PD-1/PD-L1 信号通路不仅仅影响肿瘤中 T 细胞功能, 在细菌感染中同样发挥重要作用^[49]。所以可

以说, CMTM4 凭借对 PD-L1 的调控, 间接影响表达 PD-1 的 T 细胞发生凋亡^[40,50]。

1.2.5 影响细胞间连接

参与和(或)调节细胞连接的形成是跨膜蛋白最本质的功能特性, 荷兰学者 Chrif 等便将目光转向这一特性, 研究 CMTM4 对细胞连接的作用。细胞间黏附连接(adherens junctions, AJs)对于维持血管内皮完整性十分重要, 其部分断开亦是血管出芽、新生血管形成所必须。VE-cadherin 是形成细胞间黏附连接(adherens junctions, AJs)的关键分子, 而 CMTM4 正是对其具有调节作用。Chrif 等沉默斑马鱼 CMTM4 基因, 观察到肌间血管生成障碍; 胞内免疫荧光染色显示 CMTM4 不仅与 VE-cadherin 共定位于细胞膜上, 还在胞内共定位于循环利用 VE-cadherin 的 Rab4⁺, Rab7⁺, EEA1⁺, Rab11⁺ 囊泡上, 借助细胞内吞循环运输通路促进其内化循环的同时部分囊泡还与溶酶体结合发生降解, 加快细胞膜上 VE-cadherin 新旧更替及 AJs 形成, 调节内皮细胞连接分子的黏附力以增强内皮细胞屏障功能, 但 CMTM4 不具备促进 VE-cadherin 合成的能力, 并不改变细胞总体蛋白量。总的来说, CMTM4 促进 VE-cadherin 在细胞表面的再利用, 形成黏附连接, 调节血管生成和出芽^[39]。

1.2.6 其他

除可影响体细胞功能, CMTM4 对男性生殖细胞亦有调控作用。Liu 等根据 CMTM4 在睾丸中高度保守表达这一发现^[31,41]推测其在男性生殖系统中存在一定作用, 遂对患有无精症和弱精症的患者、老年患者及 CMTM4 基因敲除小鼠模型进行表型变化和蛋白组学分析, 发现 CMTM4 表达量减少可通过抑制精子运动能力和顶体反应从而降低男性生育能力。通过对 CMTM4-KO 小鼠的睾丸和精子进行定量蛋白组学分析, 实验人员发现受调控的蛋白水平有升有降, 表达上调的蛋白基本与细胞物质运输和 DNA 结合有关, 影响精子代谢功能; 表达下调的蛋白主要与信号转导、与 α/β -微管蛋白及肌动蛋白的结合力和蛋白酶/蛋白酶抑制剂活性有关, 阻碍精子生成过程中组蛋白向精蛋白的转化, 抑制精子活力和顶体反应等功能, 减少精子产生、降低精子质量^[51,52]。

1.2.7 总结与展望

从各个研究团队的实验结果中我们可以看到在不同疾病背景下, CMTM4 的差异表达确实会影响某些细胞功能, 参与疾病的发生发展。在肿瘤领域, 无论利用 GEO、TCGA 等数据库进行生信分析还是采集临床标本做基因及蛋白水平检测, 均发现与正常癌旁组织相比, CMTM4 在癌组织的表达显著降低; 利用 CMTM4 基因编辑过的动物及细胞模型进行体内外实验, 发现 CMTM4 高表达会抑制肿瘤细胞生长、增殖等生物学行为。目前在非肿瘤性疾病领域的研究较少, 已证实的是 CMTM4 参与男性不育疾病的

发生；另外，对血管内皮细胞黏附连接的调节作用在发生血管渗漏、破裂、血管再生障碍的疾病中扮演重要角色。

至于可否用于临床工作，CMTM4 在膜上表达量的改变是否可用作诊断、分期指标，CMTM4 是否可作为药物作用的新靶点用于疾病的治疗，等待后续的研究来证实。另外，在机制方面，作为膜蛋白其是否会存在于外分泌囊泡中干预信号物质分泌，尚无从得知，仍存在很多空白亟待研究团队填补，研究还需进一步深入。未来这些研究结果都将作为证据支持、指导 CMTM4 在临床疾病中的应用。

第二章 引言

2.1 立题依据及研究背景

脓毒症与脓毒症休克是 ICU 内重症患者死亡的首要原因,根据 2016 年最新版脓毒症 3.0 诊断标准,将脓毒症定义为由于机体对感染反应失调而发生的致命性器官损害^[1],而这种损害往往是多器官、多系统的,涉及免疫功能、炎症水平、凝血状态等多机制,彼此之间具有紧密关联性,这导致脓毒症的发病机制十分复杂,至今尚未明确及统一,但可以确定的是,促炎/抗炎反应平衡被破坏、免疫发生紊乱,这些均为导致脓毒症发生发展的重要病理生理机制,影响患者预后^[53-55]。在脓毒症发病过程中,免疫亢进与免疫抑制同时存在,但疾病早期以亢进为主,呈现高炎症反应,诱发细胞因子大量释放,损伤靶器官组织细胞及免疫细胞,造成免疫细胞数量减少、功能受损;中期为混合性免疫状态,促炎与抗炎反应相抗衡;若炎症损伤持续存在,疾病进入后期,免疫抑制占主导地位,最终导致免疫麻痹^[56]。目前普遍认为与早期促炎反应相比,免疫抑制、免疫麻痹是脓症患者预后差的关键因素^[4],所以越来越多的研究人员将目光转向免疫抑制过程,研究其发生机制对于提高生存率、改善预后至关重要。

在脓毒症中,T 淋巴细胞受损、免疫功能异常是机体发生免疫紊乱的核心因素,主要表现为 T 细胞数量减少、功能减弱。在脓毒症初期大量炎性因子释放连同抗原物质均可造成 T 细胞损伤,具体来讲,T 细胞增殖能力减弱、发生过度凋亡、亚群分化失调转向 Th2 优势分化使得抑制性细胞因子大量释放,机体获得性免疫因此受到抑制,研究 T 细胞改变对探索脓毒症免疫发病机制、及早找到脓毒症免疫治疗方法十分有意义^[57,58]。国内外大量研究提出 T 细胞凋亡是造成免疫抑制的关键因素,细胞凋亡程度与病情严重程度有关,阻断细胞凋亡可提高脓毒症小鼠存活率^[18]。其中 PD-1/PD-L1 途径是脓毒症 T 淋巴细胞发生凋亡的重要机制之一,既往研究指出,PD-1/PD-L1 表达增加会削弱 T 细胞分化能力,继发感染机会增加^[27];体内实验抑制脓毒症小鼠 PD-1/PD-L1 相互作用会减少 T 细胞凋亡,提高存活率^[4],研究 PD-1/PD-L1 的调控分子成为热门话题。2017 年 Mezzadra 和 Burr 团队^[40,48]在 Nature 上刊登的有关 CMTM 家族成员 CMTM4、CMTM6 与 PD-L1 存在相互作用的文章为本研究提供新思路,本课题组开始关注 CMTM 家族成员 CMTM4,文中指出 CMTM4 高表达可延长抗原呈递细胞上 PD-L1 半衰期,使得 PD-L1 在细胞表面表达量升高,继而促进表达 PD-1 的 T 细胞发生凋亡、免疫功能受抑。由此,本课题组提出猜想:CMTM4 在脓毒症疾病模型中是否对 T 淋巴细胞免疫功能产生影响。鉴于先前无任何关于 CMTM4 分子在脓毒症中的研究,本课题组将从 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达水平入手,再研究 CMTM4 对脓毒症 T 细胞免疫功能的影响,揭示 CMTM4 在脓毒症免疫发病机制中的作用。

在基础研究中证明了淋巴细胞在脓毒症中的作用后，继而将目光转向淋巴细胞在临床中的应用价值。淋巴细胞损伤导致数量及功能异常，其为脓毒症机体免疫紊乱的主要机制^[56]，免疫活化与免疫抑制状态失衡，同时出现重要器官损害、功能衰竭^[59]，所以免疫紊乱与器官功能障碍联系密切，两者均为脓毒症中重要的病理生理过程，能否通过建立两者之间的联系以提高诊断效能已成为许多临床研究关注的热点。另外，以往文献中提到，存在急性感染的患者其凝血功能障碍往往与脓毒症发生的严重程度密切相关，而 PLT 为临床上用于监测和评价凝血功能的重要指标之一^[60]。既往研究显示，淋巴细胞相关比值中性粒细胞/淋巴细胞比值（neutrophil/lymphocyte ratio, NLR）、血小板/淋巴细胞比值（platelet/lymphocyte ratio, PLR）均可从一定程度上反映炎症发生的严重程度，与 CRP、IL-6 具有良好相关性，已逐渐在肿瘤和心脑血管疾病的诊断与预测中得以应用，被看作是部分炎症疾病的新型生物学标志物^[61-63]。新冠疫情期间，某些研究人员^[64]提出 NLR 值可用于重症 COVID-19 患者的早期识别及对预后的判断，重症患者大多伴有高水平 NLR 值，该结论更加突显 NLR 值在炎症疾病中的地位。所以，本研究关注于两项淋巴细胞相关比值——NLR 与 PLR 值，将免疫与凝血相结合，探究两者在脓毒症器官损伤临床方面的应用价值。心脏是脓毒症常见损害器官之一，严重心肌损害造成心功能障碍，进而发展为脓毒症心肌病，这类患者往往病情凶险、病死率大幅升高。早诊断、早治疗可以保护心功能、改善预后。但其病理生理过程复杂、机制未明，目前尚未建立统一的脓毒症心肌病定义和诊断标准^[65]，因此本研究具有一定研究价值。

2.2 研究方法 with 实验技术

2.2.1 第一部分——基础实验

(1) 细胞实验:

①以 2016 年发布的最新版脓毒症指南 Sepsis 3.0^[1]为诊断标准纳入脓毒症患者，抽取外周血，同时采集健康志愿者外周血，血常规检测白细胞计数及淋巴细胞计数，留取血清测定 IL-6、IL-10 浓度，以此判断患者炎症程度。利用淋巴细胞分离液体外分离人外周血淋巴细胞，通过 CD3⁺磁珠分选出外周血 T 淋巴细胞；通过 RT-qPCR 检测正常组与脓毒症组 CMTM4 基因水平表达差异；通过 Western Blot 检测两组间 CMTM4 蛋白水平差异。②体外培养人急性 T 细胞白血病 Jurkat 细胞系，给予 LPS 刺激制备脓毒症细胞模型，分别采用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测实验组与对照组基因和蛋白表达差异。③利用小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs) 沉默 Jurkat 细胞株 CMTM4 基因，给予沉默组和对照组细胞 LPS 刺激后，CCK-8 法检测两组细胞增殖情况；PI 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞细胞周期的影响；Annexin V-FITC 法对比 LPS 处理后的沉

默组与对照组凋亡比例,判断 CMTM4 对脓毒症 T 淋巴细胞凋亡的影响;ELISA 法检测 siRNAs 处理后的脓毒症 T 淋巴细胞分泌 IL-2 与 IL-10 的功能变化。

(2) 动物实验:

CLP 法制备脓毒症小鼠模型,设置 CLP 组与假手术组,于 6h、12h、24h 处死,取小鼠外周免疫器官脾、腹腔淋巴结标本,RT-qPCR 和 Western Blot 在转录和翻译水平上检测 CLP 组与假手术组 CMTM4 表达差异,利用免疫组化观察 CMTM4 在组织中的表达情况。

2.2.2 第二部分——临床研究

连续纳入 2017 年 1 月至 2019 年 8 月北京大学人民医院 ICU 病房收治的 142 例确诊脓症患者作为研究对象,进行回顾性队列研究。采集患者一般资料、既往病史、诊断为脓毒症时的血常规指标(中性粒细胞绝对值、淋巴细胞绝对值和血小板绝对值),计算 NLR、PLR 比值;记录炎症指标 CRP、入 ICU 24h 内 APACHE II 评分;记录心肌损伤标志物(cTnI、CK-MB 和肌红蛋白)。根据心脏肌钙蛋白 I(cardiac troponin, cTnI)水平,将患者分为非心肌损伤组 74 例和心肌损伤组 68 例。采用独立样本 *t* 检验或秩和检验分析组间 NLR、PLR 差异;Spearman 法分析 NLR、PLR 与心肌损伤标志物的相关性;Logistic 回归分析脓症患者发生心肌损伤的独立危险因素;绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线评估 NLR、PLR 值对脓症患者心肌损伤的预测价值。

2.3 研究目标与预期结果

2.3.1 基础实验:

探究 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达水平,并研究其对 LPS 刺激后 T 淋巴细胞功能的影响。通过预试验结果可知,脓毒症组与对照组之间 CMTM4 表达水平确有统计学差异,以此推断 CMTM4 可能对脓毒症 T 淋巴细胞功能也有一定影响,本课题组将从 T 细胞增殖能力、细胞周期、凋亡、分泌功能四大功能进行探究,并检测脓毒症小鼠 CLP 模型中外周免疫器官 CMTM4 表达情况。

2.3.2 临床研究:

纳入患者数据进行回顾性队列研究,分析免疫细胞比值 NLR、PLR 对脓毒症心肌损伤的预测价值。既往研究结论证实 NLR 与 PLR 在不同程度上可反映脓毒症炎症程度,是新型炎症指标,推测两者在脓毒症造成的心肌损伤中具有一定预测价值。

2.4 拟解决的关键科学问题

目前国内外对 CMTM 家族成员 CMTM4 的研究非常之少，且现有研究都集中于肿瘤领域，尚无任何研究涉及脓毒症；免疫机制研究是脓毒症研究中的热点，也是重中之重，我们将在脓毒症模型下研究 CMTM4 在 T 淋巴细胞上的表达水平及其对 T 淋巴细胞功能的影响，为后续深入的机制研究起到抛砖引玉的作用。

临床研究方面，我们将通过免疫细胞比值预测脓毒症器官损伤的发生，以此将脓毒症三大发病机制——免疫紊乱、器官损伤及凝血障碍——串联起来，希望能为临床上诊断器官损伤有所帮助。

第三章 CMTM4 在脓毒症外周血 T 淋巴细胞的表达及功能研究

3.1 实验材料

3.1.1 主要试剂和材料

名称	生产厂家
胎牛血清 FBS	Hyclone
RPMI1640 培养基 (含双抗)	索莱宝
RPMI1640 培养基 (不含双抗)	索莱宝
人 T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat 细胞系 (P9)	中国科学院细胞库
TRIzol 裂解液	Invitrogen
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	TOYOBO
TOYOBO	TOYOBO
SYBR Green Realtime PCR Master Mix	常州百代
RFectSP 悬浮细胞小核酸转染试剂	索莱宝
人外周血淋巴细胞分离液(FICOLL 配制)	Stem Cell
EasySep™Human CD3 Positive Selection Kit	索莱宝
BCA 蛋白定量试剂盒	索莱宝
细胞培养用 DMSO	Millipore
聚偏二氟乙烯膜 (PVDF)	Millipore
硝酸纤维素膜 (NC)	Immunoway
CMTM4 Antibody	Abcam
CMTM4 Antibody (ICC 用)	Proteintech
GAPDH Antibody	Proteintech
β-actin Antibody	Proteintech
辣根酶标记山羊抗兔 IgG	Proteintech
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG	索莱宝
RIPA 裂解液	索莱宝
磷酸酶抑制剂	索莱宝
5×Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液	索莱宝
10×电转移缓冲液	索莱宝
10×TBST 缓冲液	索莱宝

脱脂奶粉	新赛美
ECL 化学发光检测试剂盒	索莱宝
彩虹蛋白 Marker	索莱宝
5×蛋白上样缓冲液 (含 DTT)	索莱宝
SDS-PAGE 预制胶	日本同仁
CCK-8 试剂	索莱宝
细胞凋亡检测试剂盒	凯基
细胞周期检测试剂盒	汉恒生物
人 CMTM4 基因 siRNA oligos	索莱宝
Human IL-10 ELISA KIT	索莱宝
Human IL-2 ELISA KIT	索莱宝
台盼蓝溶液	Sigma
脂多糖 (LPS)	索莱宝
1×PBS 缓冲液	索莱宝
DEPC 水	Corning
培养皿、培养板、离心管	Thermo
qPCR 96 孔板	Axygen
1.5ml 离心管	Axygen
无菌吸头	Corning
移液管 (1ml、5ml、10ml)	Corning
冻存管	Corning
酶标板	索莱宝
一次性巴氏德吸管	索莱宝
电转厚滤纸	永泰兴成
Western 洗膜盒	索莱宝
冻存盒	华康卫材
医用手术非吸收缝合线 (4#)	LEICA
LEICA819 刀片	纽约世联
眼科剪、眼科镊、持针器	

其余试剂如氯仿、异丙醇、甲醇、无水乙醇等均为国产试剂。所有试剂均按要求分装、储存, 在保质期内按要求使用。

3.1.2 主要仪器

名称	生产厂家
移液枪 (2.5μl、20μl、100μl、200μl、1000μl)	Eppendorf
直热式 CO ₂ 培养箱	Thermo
iMark 酶标仪	Bio-Rad
多功能酶标仪	BioTek
FACS Verse 流式分析仪	BD
SP8 激光共聚焦荧光显微镜	Leica
超净工作台	北京长城
5810R 台式离心机	Eppendorf
2-16K 型低温高速离心机	Sigma
GS-15R 型离心机	Beckman
PCR 扩增仪	Biometra
实时定量 PCR 仪	Agilent
化学发光成像仪	Alpha Innotech
垂直板蛋白电泳装置	Bio-Rad
蛋白质湿式电转移装置	Bio-Rad
-20℃低温冰箱	Haier
-80℃超低温冰箱	Haier
MZ7.5 普通光学显微镜	Leica
NanoDrop 超微量紫外分光光度仪	Thermo
制冰机 SIM-F121	Sanyou
电热恒温水槽 DK-8D 型	上海一恒
BS300S-WE1 型电子天平	赛多利思

所有仪器均定期检测和校准。

3.1.3 实验标本

(1) 临床标本 以2016年最新版脓毒症指南Sepsis 3.0作为脓毒症诊断标准^[1]，纳入2019年10月至2021年1月收入北京大学人民医院重症医学科及创伤救治中心的部分确诊脓毒症患者作为疾病组，同时纳入年龄、性别与脓毒症组基本匹配的健康志愿者作为正常对照组，共计纳入脓毒症患者15名，健康志愿者8名。

参考2016年新版脓毒症指南^[1]和以往大多数脓毒症研究临床标本的纳入与排除标准，结合本研究的研究目的，制定如下标准筛选标本病例来源。纳入标准：①年龄≥18周岁者；②符合Sepsis 3.0诊断标准^[1]。排除标准：①妊娠期；②患有血液系统疾病、恶性肿瘤晚期、慢性肝肾功能不全者；③接受化疗、使用糖皮质激素或免疫抑制剂治疗

者；④1周内使用影响凝血功能及血小板聚集的药物；⑤入ICU前在较短时间内有大量失血和（或）输血史者。

记录纳入患者的基本特征和临床情况（包括年龄、性别、SOFA 评分、既往疾病史、手术史及用药史等），留取被诊断为脓毒症时的血清与EDTA抗凝的外周血全血，通过血常规化验记录白细胞计数及淋巴细胞绝对值和百分比；通过血清细胞因子检测，记录IL-6、IL-10浓度。入选患者及健康志愿者均签署实验知情同意书，受试者有权在实验期间任何时候选择退出，本实验已通过北京大学人民医院医学研究伦理委员会审查，并予以批准实验。

（2）体外细胞实验 选用人急性T淋巴细胞白血病细胞系Jurkat细胞系（购于中国科学院细胞库）作为研究对象，给予LPS刺激制备脓毒症T淋巴细胞模型。

3.2 实验方法

3.2.1 人外周血 T 淋巴细胞的分离

血液标本来自 EDTA 抗凝的入选脓毒症患者和健康志愿者外周血。取 15~16ml 外周血，采用索莱宝人外周血 T 淋巴细胞分离液（Ficoll 配置）通过密度梯度离心分离得到外周血淋巴细胞，具体步骤如下：①用等体积 PBS 稀释全血。②在 15ml 离心管中按实际情况加入一定量淋巴细胞分离液，再将稀释后的外周血用巴氏滴管小心滴加到分离液液面上方，使其形成明显的分层平铺界面，保持两种液体之间界面清晰。③室温，水平转子 500~1000g，离心 20~30min。④离心结束后取出，可见离心管内明显液面分层：底部为红细胞、粒细胞碎片，中间透明层为分离液层，最上层为稀释了的血浆层，血浆层与分离液层之间的白膜即为淋巴细胞层。⑤1ml 移液器小心吸取白膜层（含淋巴细胞）到新的 15ml 离心管中，加入适量 PBS 或细胞洗涤液稀释并洗涤细胞。转速 250g，离心 10min。⑥倒掉上清液，再用 5ml PBS 或细胞洗涤液重悬细胞，250g，离心 10min。⑦重复上一步骤。⑧倒掉上清，细胞重悬备用。

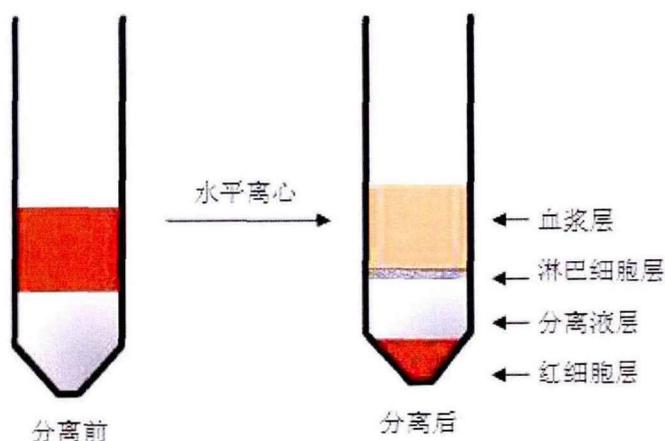


图 3.1 外周血淋巴细胞分离示意图

采用EasySep™Human CD3 Positive Selection Kit II (Stem Cell 公司, 货号: 17851) 阳性分选CD3⁺T淋巴细胞, 按说明书进行分选: ①将分离出的淋巴细胞悬液转移至 5ml 的聚乙烯管内。②加入EasySep®阳性选择混合物(EasySep® Positive Selection Cocktail) 100 μ L/ml, 混匀, 室温下(20-25 $^{\circ}$ C) 孵育3-5分钟。③轻轻吹洗混匀磁珠RapidSpheres™ (勿涡旋震荡), 样品中加入磁珠(60 μ L/ml), 混匀后室温孵育3-5分钟。④加入缓冲液, 轻轻颠倒2-3次混匀, 将管固定在配套磁力架的磁极中, 放置6-10分钟。⑤磁铁和试管呈倾斜位, 手拿着磁铁, 慢慢倒掉上清, 随后保持试管和磁极在倾斜位 2-3秒后放正。⑥拿掉试管, 再加入1 \times PBS洗涤细胞, 轻微吹洗2-3次后将试管再次放回磁铁中5分钟。⑦重复⑤⑥两步2-3次。⑧移去试管, 重悬细胞在1 \times PBS中备用。

3.2.2 T 淋巴细胞系的培养及体外脓毒症细胞模型的构建

Jurkat细胞呈悬浮生长, 选用培养皿和培养板培养细胞, 细胞培养于含有8-10% FBS的RPMI 1640培养基中, 其中含1% HEPES、青霉素100 U/ml、庆大霉素100 U/ml, 置于参数为37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中培养, 根据细胞生长状态, 3-4天可对细胞更换新鲜培养基, 根据需要选择继续培养或进行传代培养。购入的细胞传3-4代再进行后续实验。

根据LPS浓度梯度预试验结果, 加入浓度为1 μ g/ml LPS (RPMI 1640培养基稀释) 刺激Jurkat细胞6h、12h、24h, 37 $^{\circ}$ C温箱中培养, 等到各组时间点后1200r 离心10min收集细胞沉淀备用, 上清液4000r离心20min后吸出上清至新EP管中, -80 $^{\circ}$ C冰箱内保存备用; 对照组细胞给予等体积RPMI 1640培养基刺激6h, 后续操作同上。

3.2.3 Trizol 法提取细胞总 RNA 与逆转录合成 cDNA

(1) 提取 T 淋巴细胞总 RNA

①将处理好的T淋巴细胞离心去上清，保留细胞沉淀， $(5-10) \times 10^6$ 个细胞加入1ml Trizol (Invitrogen, 货号: 15596026)，反复用移液枪吹吸、裂解细胞，放于-20℃冰箱内过夜。②取出解冻后，4℃ 12000g离心10分钟。将上清液转移至干净EP管中，15-30℃环境孵育5分钟。③管中加入0.2ml氯仿，盖上盖子，剧烈震荡15s，室温孵育2-3分钟。4℃ 12000g离心15分钟，上层水相中为液态RNA。④取上层液体至干净EP管中，加入0.6ml异丙醇（每1ml Trizol）沉淀其中的RNA，上下颠倒混匀5次以上，室温孵育10分钟。4℃离心12000g，10分钟，即可在试管底部见到白色沉淀，即RNA。⑤弃上清，用1ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀，涡旋振荡混匀1-2s，4℃ 7500g，离心10分钟。小心倒弃乙醇，将RNA沉淀在室温中晾干5-10分钟。⑥55-60℃预热DEPC水，取20-50μL DEPC水溶解RNA沉淀，移液枪吹打数次。⑦用NanoDrop仪检测RNA浓度。

(2) 逆转录合成cDNA

按照ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 货号 No.FSQ-301)说明书，依次加入RNA模板、引物、4×DN Master Mix和gDNA Remover 混合物、DEPC 水，轻轻搅拌均匀，37℃孵育5min。之后在反应液中加入5×RT Master Mix II，37℃ 15min，接着98℃ 5min，最后温度设置为4℃放置。

3.2.4 RT-qPCR 检测 T 淋巴细胞 CMTM4 基因表达

按照SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, 货号No.QPK-201)说明书，依次加入cDNA模板、引物、蒸馏水和SYBR Green Mix，按照三步法扩增，最后进行扩增曲线和溶解曲线的分析，添加量按说明书添加，总体积20μl，上下游引物稀释成10uM，每样本加入0.8μl，循环条件见图3.2。采用相对定量的方法计算目的基因的表达差异。目的基因人引物序列见表3.1



图 3.2 qPCR 底物上样量与反应步骤流程图

表 3.1 qPCR 人引物序列

目的基因	引物序列
hCMTM4-V2 Forward	AGTGCgTTTGTGGTGACTG

hCMTM4-V2 Reverse	GGTTTAAAGCAGCCAGTACGA
h β -actin Forward	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT
h β -actin Reverse	CAGGGCAGTGATCTCCTTCT
目的基因	引物序列
hGAPDH-Forward	GGTTTAAAGCAGCCAGTACGA
hGAPDH-Reverse	GGAAGATGGTGATGGGATT

3.2.5 Western Blot 检测 T 淋巴细胞 CMTM4 蛋白表达

(1) RIPA裂解液提取蛋白

步骤如下：①离心收集T淋巴细胞沉淀后置于冰上，根据细胞沉淀量加入100-250微升RIPA裂解液（加入1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂），吹打混匀细胞。②4℃摇床上孵育30-40min，使细胞充分裂解。③将裂解后的样品10000-14000g离心20-30分钟，取上清备用。长期保存于-80℃。

(2) BCA法测定蛋白浓度

选用BCA蛋白浓度测定试剂盒（索莱宝）测定提取蛋白液的浓度。步骤如下：①准备工作液：根据标准品和样品总份数，BCA试剂与Cu试剂按照50：1的体积比混合，配制BCA工作液，充分混匀备用。②稀释标准品：取10 μ l BSA标准品加入1.5ml离心管中，加入1 \times PBS稀释至100 μ l，使标准品终浓度为0.5mg/ml。将标准品按0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 μ l加到96孔板中，加PBS稀释液补足至20 μ l。③将样品作适当稀释，加20 μ l 样品到96孔板中。④各孔加入200 μ l BCA工作液，塑料膜覆盖96孔板封口防止挥发，37℃放置20-30分钟。⑤取出孔板放入酶标仪，测定波长在A562nm处的吸光度，根据标准曲线公式计算出提取蛋白的浓度。

(3) Western Blot检测

将配好的SDS-PAGE胶固定于电泳槽内，倒入电泳液，将一定体积的各组样本加入上样孔内（各组蛋白上样量均为20 μ g）进行电泳，150V电泳45min。用蛋白质湿转装置将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上，脱脂奶粉配置5%牛奶作为封闭液，室温封闭两小时。用5%封闭液稀释一抗，4℃摇床上孵育过夜。取出后用1 \times TBST缓冲液洗3次膜，每次10分钟。用1 \times TBST稀释辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体，室温孵育1小时，洗3次膜，每次10分钟。凝胶成像系统对膜进行化学发光成像，拍照记录条带结果。

3.2.6 小干扰 RNA 敲减 T 淋巴细胞细胞 CMTM4 基因

利用小干扰 RNA（Small interfering RNAs, siRNAs）敲低人 T 淋巴细胞 CMTM4 基因，siRNAs 由上海汉恒生物科技有限公司合成，有效序列如下表 3.2。转染试剂选择 **RfectSP 悬浮细胞小核酸转染试剂（常州百代生物，货号：11026）**，按照转染试剂说明书对培养板中 Jurkat 细胞进行 siRNAs 转染操作。先在 12 孔板中摸索最佳转染条件，再将 Jurkat 细胞培养于 6 孔板中进行转染，siRNAs 终浓度取 100nM，Rfect 转染

试剂取 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 培养 48-72h, 检测基因抑制效果, 若转染效果不佳, 可调整转染试剂浓度及转染时间。

表 3.2 人 siRNAs 序列

序列名称		siRNAs 序列 (5'-3')
si-CMTM4-4	正义	GCAGAAAUUGCUGCCGUGAdTdT
	反义	UCACGGCAGCAAUUUCUGCdTdT
si-CMTM4-6	正义	CCUGAUUGCAUUCAUCUGCdTdT
	反义	GCAGAUGAAUGCAAUCAGGdTdT
si-NC	正义	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT
	反义	ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT

3.2.7 CCK-8 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞增殖功能的影响

按 CCK-8 试剂 (日本同仁) 说明书对转染 siRNAs 和未转染的细胞进行细胞增殖检测。步骤如下: ①在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ l / 孔), 由于悬浮细胞较难显色, 遂使细胞量在 10⁵ 个细胞/孔, 每组设置 4-6 个副孔。将培养板放在培养箱预培养 (在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下) 4-6 小时。②向每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 小心不要生成气泡。将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。③用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

3.2.8 PI 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞细胞周期的影响

选择细胞周期检测试剂盒 (凯基生物, 货号: KGA-511) 探究 CMTM4 对 LPS 刺激下的 T 淋巴细胞生长周期是否有影响。步骤如下: ①细胞悬液离心后倒掉上清, 向细胞沉淀中加入 70% 冷乙醇 500 μ l 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜。②染色前加入等体积 PBS 离心洗去固定液。③细胞悬液用 200 目筛网过滤一次。④用 PBS 洗涤细胞一次, 2000rpm 离心 5min, 弃上清, 加入 PBS 使细胞浓度为 1 \times 10⁶/ml, 取 1ml 细胞悬液。⑤配置染色工作液, 每个样本用 500 μ l 工作液孵育, 临用前将 Rnase A: PI 工作液按 1: 9 体积配制成染色工作液。向细胞中加入 500 μ l 工作液, 室温避光 30-60min。⑥上机检测, 记录激发波长 488nm 处红色荧光。

3.2.9 Annexin V-FITC 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (索莱宝, 货号: CA1020) 进行凋亡检测。按照说明书操作, 步骤如下: ①用双蒸水将 10 \times Binding Buffer 稀释至 1 \times , 每个样品用 3ml, 根据样本数配制所需 Binding Buffer。②每个样本收集 1 \times 10⁶ 个细胞, 用预冷的 PBS 洗涤。③用 1ml 1 \times Binding Buffer 重悬细胞, 300g 离心 10min, 弃上清。④用 1ml 1 \times Binding Buffer 重悬细胞, 使细胞的密度达到 1 \times 10⁶ 个/ml。⑤每管加入 100 μ l 细胞悬液 (即 1 \times 10⁵ 个细胞)。⑥向管内加入 5 μ l Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 室温避光

孵育 10min。⑦加入 5 μ l PI, 室温避光孵育 5min。⑧加入 PBS 至 500 μ l, 轻轻混匀。在 1 小时内用流式细胞仪检测, 每组记录 20000 个事件。

3.2.10 ELISA 法检测 CMTM4 对 T 淋巴细胞分泌功能的影响

采用酶联免疫吸附实验 (ELISA 实验) 研究 CMTM4 对 LPS 刺激后 T 淋巴细胞分泌功能的影响。选用 Human IL-2 ELISA KIT 试剂盒和 Human IL-10 ELISA KIT 试剂盒 (索莱宝, 货号: SEKH-0008, SEKH-0018) 检测细胞上清中 IL-2 和 IL-10 水平。

(1) 分离细胞上清:

收集孔板内的细胞悬液, 4 $^{\circ}$ C 1000g 离心 20min, 分装于小 EP 管并于 -80 $^{\circ}$ C 下保存, 若 24 小时内检测可放入 4 $^{\circ}$ C 储存, 要避免反复冻融。

(2) 检测 IL-2、IL-10 浓度:

步骤: ①提前拿出试剂盒使试剂恢复至室温, 加入标准品/样本前, 洗板 3 次并甩干。②反应孔中加入 100 μ l 样本与标准品, 封板, 放至 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 90 min, 随后拍板、洗板 4 次。③反应孔中加入 100 μ l 生物素化抗体工作液, 封板, 于 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 min, 拍板、洗板 4 次。④反应孔中加入 100 μ l 酶结合物工作液, 封板, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 30 min, 拍板、洗板共 5 次。⑤加入 100 μ l 显色底物, 封板后于 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。⑥加入 50 μ l 终止液, 确保 5 分钟内用酶标仪在波长为 450nm 处测量吸光度值, 根据标准曲线求出上清中 IL-2、IL-10 浓度。

3.3 统计学方法

每组实验至少重复三次, 多次数据均纳入统计, 每次实验设置三个或以上重复孔, 取重复孔均值统计。采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行分析处理及作图。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 进行统计描述; 符合正态分布的计量资料采用 t 检验分析是否存在显著性差异, 非正态分布采用秩和检验; 当多组之间进行比较时采用单因素方差分析。定性资料采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。ns 代表无显著性差异; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

3.4 实验结果

3.4.1 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达情况

(1) 比较脓毒症患者与健康志愿者炎症程度

为探究脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞中 CMTM4 表达情况, 根据纳入标准选取脓

毒症患者 15 例、健康志愿者 8 例抽取外周血，进行血常规和血清炎症因子 IL-6、IL-10 检测，以判断患者炎症严重程度。结果显示脓毒症组较正常组炎症程度明显增强，白细胞增加、淋巴细胞百分比降低、IL-6 和 IL-10 均显著升高（见图 3.3），差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明脓毒症组炎症程度较重，具体数值见表 3.3。

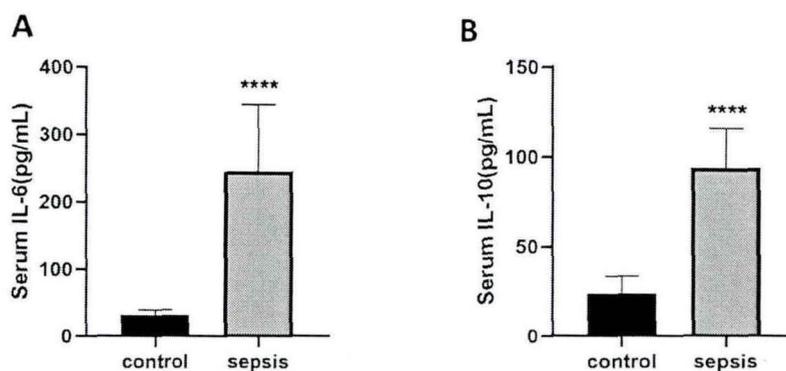


图 3.3 脓毒症患者与健康志愿者血清炎症指标对比。A: IL-6; B: IL-10 ($P < 0.0001$)。

表 3.3 脓毒症患者与健康志愿者炎性指标对比 ($\bar{x} \pm s$)

分组	白细胞计数 ($10^9/L$)	淋巴细胞百分 比 (%)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
正常组 (n=8)	6.45±1.36	30.45±3.56	31.93±7.52	23.79±9.80
脓毒症组 (n=15)	12.20±2.95	7.91±2.79	245.49±99.07	93.89±21.95
P 值	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

(2) CMTM4 在脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞中表达上调

人血淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞，再利用 EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit 阳性分选出 T 淋巴细胞，检测 CMTM4 在其上的表达水平，从 15 例患者中随机抽取 3 位患者的 Western Blot 结果（即 Patient 1-3），结果如图 3.4 所示，与健康志愿者相比，脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞上 CMTM4 表达水平升高，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

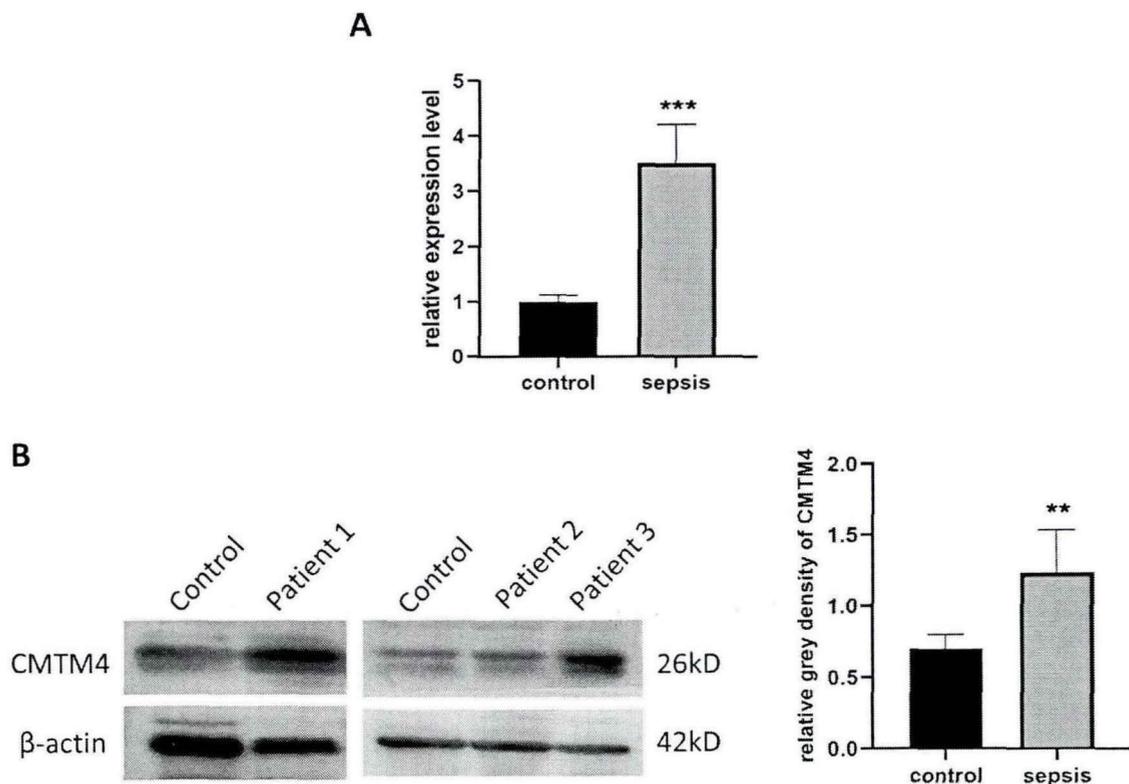
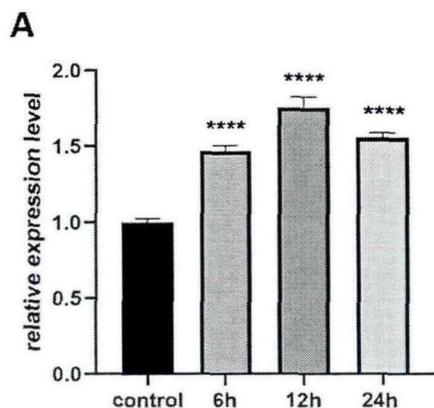


图 3.4 脓毒症患者与健康志愿者 T 淋巴细胞中 CMTM4 表达情况。A: RT-qPCR 结果对比患者 (n=15) 与健康者 (n=8) T 淋巴细胞中 CMTM4 变化 ($P<0.001$) ; B: 随机抽取 3 位患者 (不同实验批次) 的 Western Blot 结果, 灰度分析统计图示患者与健康者 T 淋巴细胞中 CMTM4 蛋白水平具有显著性差异。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

(3) CMTM4 在 LPS 刺激后的 Jurkat 细胞中表达上调

体外细胞实验采用 LPS 刺激 Jurkat 细胞诱导细胞脓毒症模型。1 μ g/ml LPS 刺激细胞 6h、12h、24h, 到相应时间点后离心收集细胞, 分别提取总 RNA 和蛋白进行 CMTM4 表达水平的检测, 结果如图 3.5, LPS 刺激 Jurkat 细胞后, CMTM4 随时间延长而表达量增加, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。



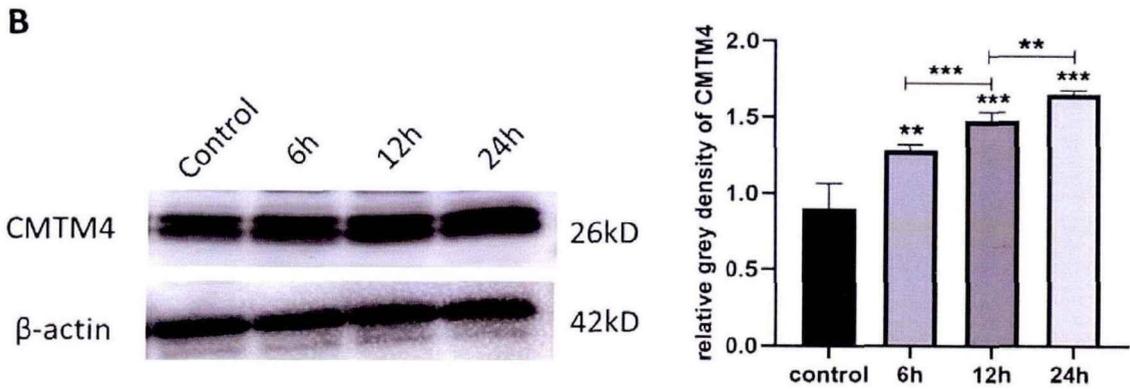


图 3.5 1 μ g/ml LPS 刺激 Jurkat 细胞 6h、12h、24h 后 CMTM4 表达变化情况。A: RT-qPCR 检测 Jurkat 细胞在各时间点表达 CMTM4 变化 ($P < 0.0001$)；B: Western Blot 检测各时间点细胞 CMTM4 蛋白水平，条带图与灰度分析统计图示 LPS 刺激组与对照组、6h 组与 12h 组、12h 组与 24h 组相比，CMTM4 表达水平均具有显著性差异。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

3.4.2 CMTM4 对脓毒症 T 淋巴细胞功能的影响

(1) 验证 siRNAs 敲低 Jurkat 细胞 CMTM4 基因效果

由于悬浮细胞不易转染，遂提高 siRNAs 浓度和转染试剂用量，siRNAs 终浓度取 100nM，Rfect 转染试剂取 100 微升；并延长转染时间，37 $^{\circ}$ C 培养 72h 检测基因水平抑制效果，96h 后检测蛋白水平抑制效果，转染效率见图 3.7，转染效果见图 3.6。转染效率可达 90%以上，从 RT-qPCR 和 Western Blot 结果看，siRNAs 敲减有效，细胞可进行后续功能实验。

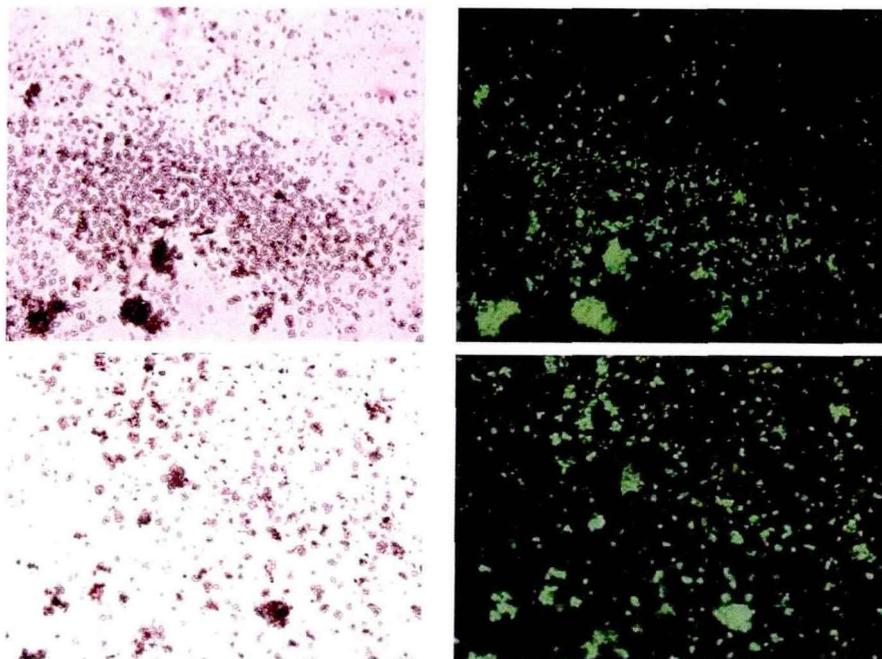


图 3.6 荧光显微镜观察 siRNAs 转染 Jurkat 细胞效率。左侧为光镜下图像，右侧为荧光显微镜下图像（放大倍数： $\times 40$ 倍）

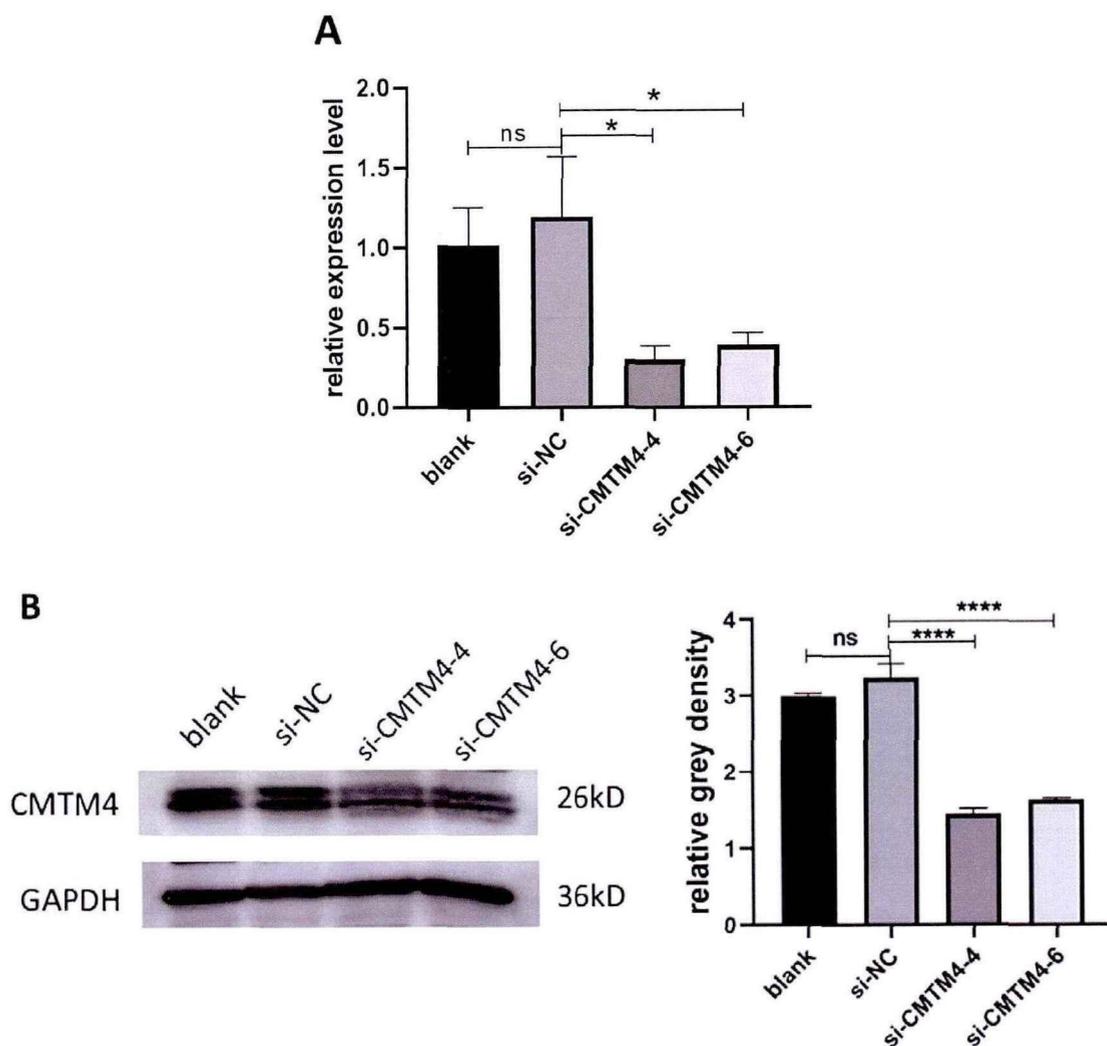


图 3.7 验证 siRNAs 转染 Jurkat 细胞后对 CMTM4 表达的干预效果。A: 转染后 qPCR 验证 CMTM4 表达水平结果; B: 转染后 Western Blot 验证 CMTM4 表达水平结果。Blank 代表未转染 siRNAs 的空白对照组细胞; si-NC 代表转染 si-NC 的阴性对照组细胞; si-CMTM4 代表转染了 si-CMTM4 组 T 淋巴细胞。ns 无显著性差异, $*P < 0.05$, $**** P < 0.0001$

(2) CMTM4 抑制 LPS 刺激后 T 淋巴细胞的增殖活性

根据预试验结果, 选择炎症程度较强的 24h 作为 LPS 刺激细胞的时间, CCK-8 法检测转染 siRNAs 和未转染的 T 淋巴细胞在 LPS ($1\mu\text{g/ml}$) 刺激 24h 后的细胞液 OD 值变化, 以反映细胞增殖活性改变情况, 结果如图 3.8。未转染 siRNAs 的 blank 组 (空白对照组) 给予 LPS ($1\mu\text{g/ml}$) 刺激 24h 后与未给予 LPS 刺激的 blank 组相比, OD 值

减小, 细胞活性有所下降, 说明脓毒症 T 淋巴细胞活性受抑; 再对转染 siRNAs 的细胞进行活性检测, si-NC+LPS 组 (阴性对照组) 与 blank+LPS 组 OD 值类似; 与转染 si-NC 组相比, 转染 si-CMTM4 组在 LPS 刺激下 OD 值更高, 增殖活性更强 ($P<0.05$)。

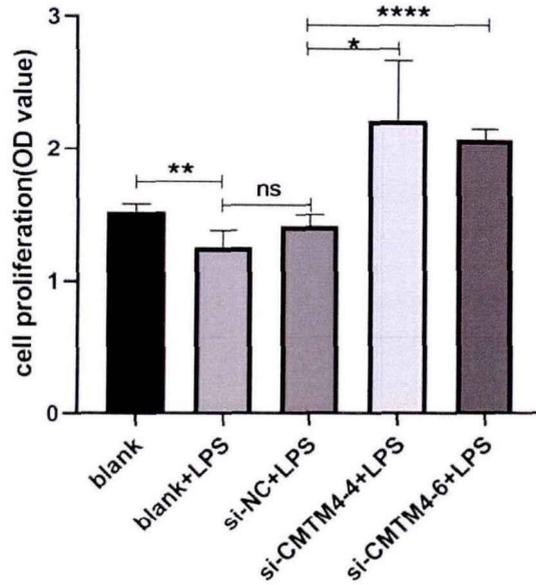


图 3.8 CCK-8 法检测 CMTM4 基因敲低后的 T 淋巴细胞在 LPS 刺激下增殖活性的变化。Blank 组为未转染 siRNAs 的空白对照组细胞; si-NC 组为转染 si-NC 的阴性对照组细胞; si-CMTM4 组为有效敲减 CMTM4 基因的 T 淋巴细胞。ns 无统计学差异, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$

(3) CMTM4 影响 LPS 刺激后 T 淋巴细胞的细胞周期

用 $1\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激细胞 6h、12h、24h 后通过流式细胞术进行细胞生长周期检测, 结果如图 3.9, 转染 si-CMTM4 的细胞在 S 期所占比例增加, 而阻滞于 G2/M 期的细胞比例减少, 以 6h 和 12h 最为明显, 差异具有统计学意义。实验结果表明, CMTM4 诱导了 LPS 刺激的 T 淋巴细胞生长周期发生 G2/M 期阻滞。

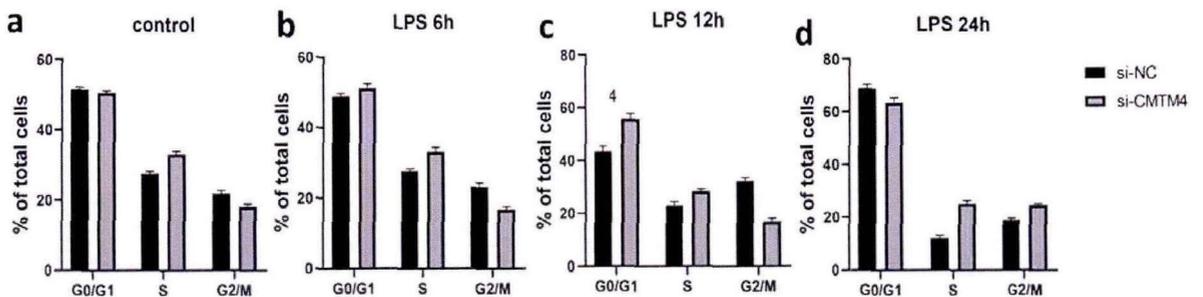
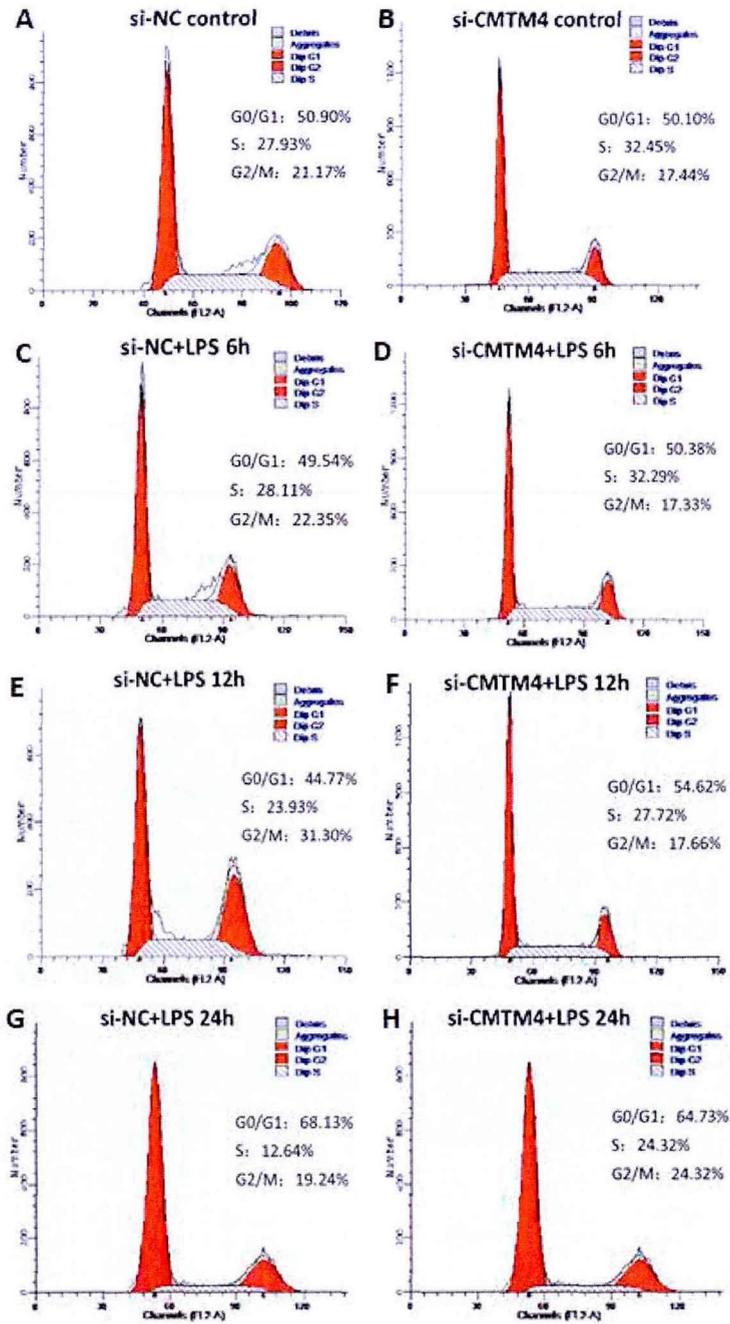
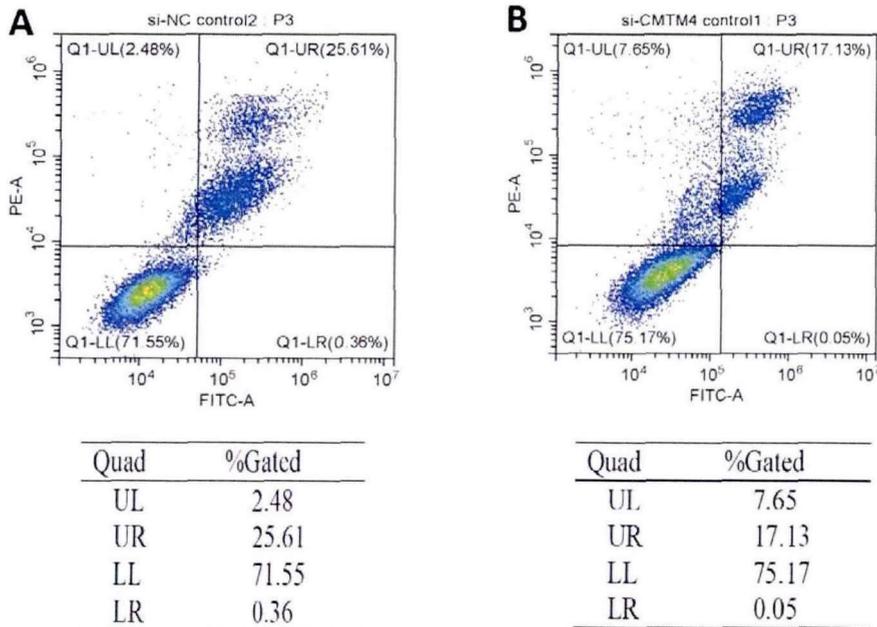
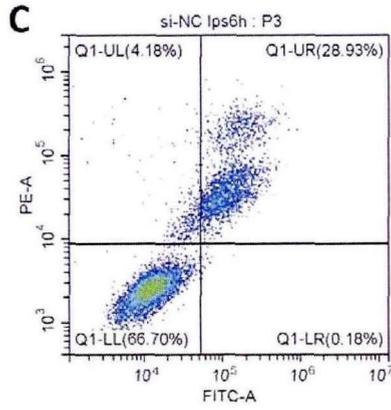


图 3.9 CMTM4 对 LPS 刺激的 T 淋巴细胞生长周期的影响。图 ACEG 分别为 si-NC 组中空白对照及 LPS 刺激 6h、12h、24h 后结果，BDFH 为 si-CMTM4 组中空白对照及 LPS 刺激 6h、12h、24h 后结果；图 abcd 为细胞在不同阶段生长周期所占比例，可见敲低 CMTM4 后，LPS 刺激的 T 淋巴细胞在 S 期所占比例增加，G2/M 期比例降低。

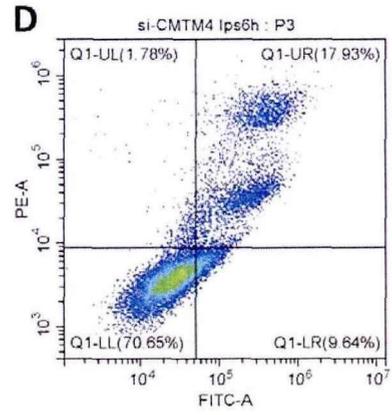
(4) CMTM4 促进 LPS 刺激 T 淋巴细胞发生凋亡

用 1 μ g/ml LPS 刺激细胞 6h、12h、24h 后对细胞染色，通过流式细胞术进行细胞凋亡检测，结果如图 3.10，敲低 CMTM4 后，LPS 刺激转染了 si-CMTM4 的 T 淋巴细胞，发现较未转染细胞，其发生凋亡的比例明显降低；CMTM4 被敲减的 T 淋巴细胞受到 LPS 刺激后存活率升高。该结果证明，CMTM4 促进 LPS 刺激的 T 淋巴细胞发生凋亡。

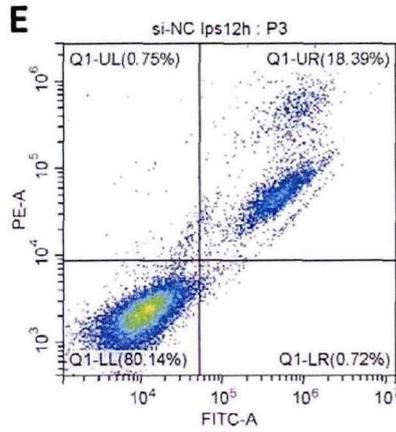




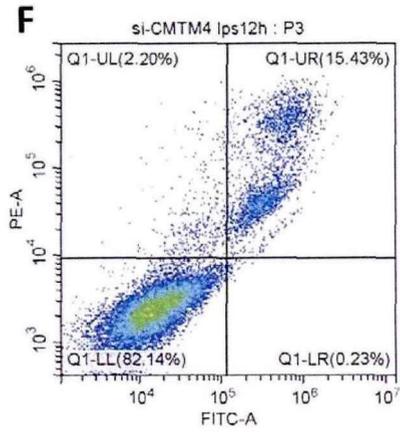
Quad	%Gated
UL	4.18
UR	28.93
LL	66.70
LR	0.18



Quad	%Gated
UL	1.78
UR	17.93
LL	70.65
LR	9.64



Quad	%Gated
UL	0.75
UR	18.39
LL	80.14
LR	0.72



Quad	%Gated
UL	2.20
UR	15.43
LL	82.14
LR	0.23

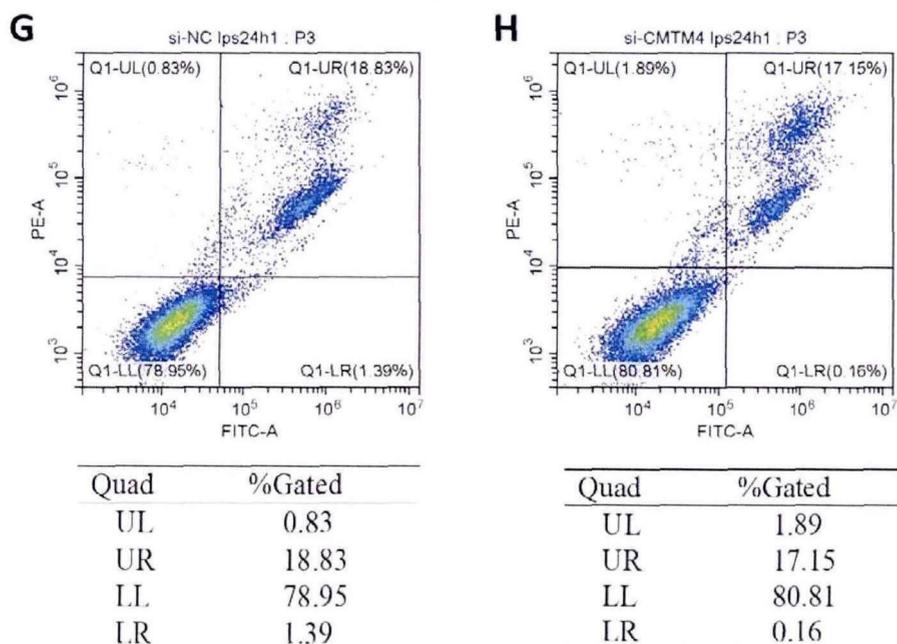


图 3.10 流式细胞术检测 CMTM4 对 LPS 刺激的 T 淋巴细胞发生凋亡的影响。图 ACEG 为 si-NC 组空白对照及 LPS 刺激 6h、12h、24h 后细胞凋亡比例，图 BDFH 对应 si-CMTM4 组空白对照及 LPS 刺激 6h、12h、24h 后细胞凋亡比例，细胞所占比例见图 中及对应的表中标注。

(5) CMTM4 抑制 LPS 刺激的 T 淋巴细胞分泌 IL-2 和 IL-10

IL-2 和 IL-10 是活化 T 细胞产生的炎性相关细胞因子,在免疫应答和炎症反应中有着重要作用,可反映炎症水平及 T 细胞活化状态。1μg/ml 的 LPS 刺激空白对照组与 CMTM4 基因敲低组的 T 淋巴细胞,作用 24 小时后提取细胞上清检测 T 细胞分泌 IL-2、IL-10 的水平变化。结果如表 3.4 及图 3.11 所示,沉默 CMTM4 后的 T 淋巴细胞在受到 LPS 刺激下,分泌能力较 si-NC 组有所增强 ($P<0.05$)。可见 CMTM4 对 T 淋巴细胞分泌 IL-2 和 IL-10 具有一定抑制作用。

表 3.4 ELISA 检测 LPS 刺激转染 siRNAs 的 T 淋巴细胞分泌能力的变化($\bar{x} \pm s$)

分组	IL-2 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
si-NC 组	371.31±5.31	9.38±2.01
si-CMTM4 组	395.82±5.88	10.81±2.65
si-NC+LPS 组	90.43±9.12	35.44±4.22
si-CMTM4+LPS 组	170.13±9.19	54.87±4.65

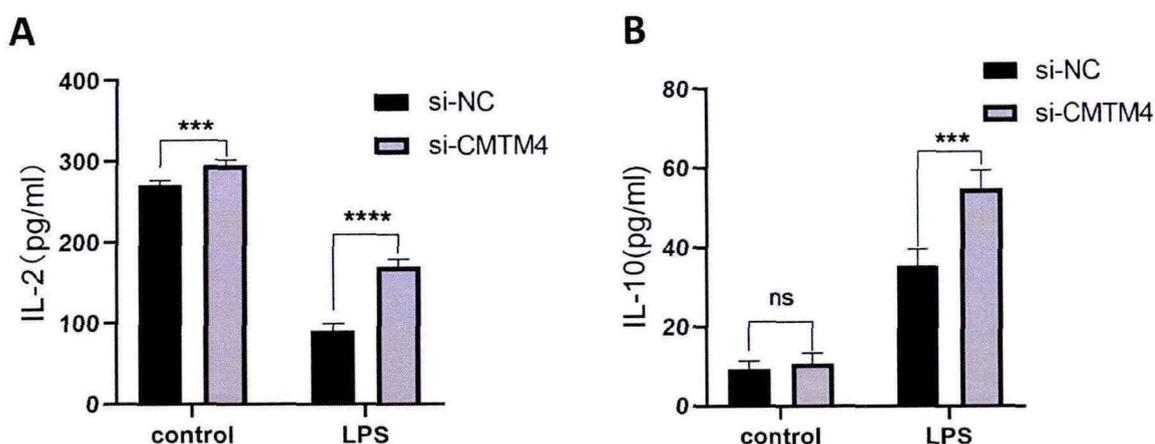


图 3.11 ELISA 检测 LPS 刺激转染 siRNAs 的 T 淋巴细胞分泌能力的变化。A: 细胞上清中 IL-2 浓度。B: 细胞上清中 IL-10 浓度。ns 代表无显著性差异; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

3.5 讨论

免疫紊乱是脓毒症发病的重要机制之一，在严重感染早期，大量炎症因子释放及抗原、补体系统共同作用，对免疫细胞造成损伤，以 T 淋巴细胞损伤最常见，后果也最为严重，T 细胞损伤在脓毒症中自始至终均存在，若控制效果不佳，脓毒症进入中后期，则导致免疫抑制的发生，表现为抑制性免疫检查点分子如 PD-1/PD-L1 表达增加，免疫细胞数量减少、功能减弱，这是造成患者病情加重、预后不良的主要因素^[66]。在机体抗感染能力较强的情况下，T 细胞可发挥免疫调理作用，其分化出的不同亚群分别发挥激活与抑制的作用，因而对维持脓毒症促炎反应和抗炎反应平衡具有重要影响；但若促炎细胞过度激活，释放大量促炎因子损伤 T 细胞免疫功能，机体将进入免疫抑制甚至免疫麻痹状态，病死率升高^[27,67]。研究脓毒症免疫机制，特别是免疫抑制机制，对于治疗脓毒症、改善预后十分重要。

PD-1/PD-L1 途径是造成免疫细胞凋亡、发生功能障碍的重要分子机制之一，PD-L1 高水平表达促进 T 细胞凋亡、抑制 T 细胞免疫功能^[66,68]。2017 年 Nature 刊登的文章^[40]中提到在肿瘤环境中，表达在胞膜上的 CMTM4 分子与抗原提呈细胞表面 PD-L1 存在相互作用，抑制其泛素化、延长半衰期，介导 T 淋巴细胞发生 PD-1/PD-L1 的结合，造成 T 细胞免疫衰竭、发生免疫逃逸。这提示我们可以针对 CMTM4 是否在脓毒症中同样发挥抑制 T 细胞免疫的作用展开研究，由此本课题围绕 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达水平和对细胞免疫功能的影响而展开。

依据 2016 年最新版脓毒症指南 Sepsis 3.0^[1]筛选脓症患者，既往研究证明，当脓症患者淋巴细胞计数低于正常水平、IL-6、IL-10 水平升高时，往往意味着患者体内炎症反应增强，获得性免疫系统已开始受损^[69,70]，遂本课题将这三项作为反映机体炎

症状态的生物学指标,通过观察白细胞计数、淋巴细胞百分比以及炎性因子 IL-6、IL-10 水平判断患者炎症程度。本课题首先对淋巴细胞明显降低的确诊脓毒症患者采集外周血分离 T 淋巴细胞,选择健康志愿者作为对照组,结果示脓毒症组白细胞增加、淋巴细胞百分比降低、IL-6 和 IL-10 均显著升高,说明脓毒症组较正常组炎症程度明显增强,继而对 T 淋巴细胞上 CMTM4 的表达进行检测,判断两组间是否有差异,结果可以看到脓毒症组 CMTM4 表达水平明显升高。由于患者的个体差异性较大、基础状态和疾病严重程度不易控制,干扰因素较多,遂进一步开展体外细胞实验,采用 LPS 刺激 Jurkat T 淋巴细胞制备体外脓毒症细胞模型,对炎症状态下的 T 细胞进行 CMTM4 分子在转录和翻译水平变化的检测,实验结果与病人变化趋势相类似,较正常对照组而言,CMTM4 在脓毒症 T 细胞中表达水平增加。由此可以看出在脓毒症中 T 淋巴细胞表达 CMTM4 的水平具有升高的趋势。

编码基因在脓毒症状态下存在差异表达,说明该基因可能影响脓毒症机体某些功能,实验已证明 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中表达确有明显差异,进一步推测其是否对细胞免疫功能亦有影响。本课题分别从 T 细胞的增殖活性、生长周期、细胞凋亡和分泌功能四个方面入手,比较 CMTM4 组与 CMTM4 敲低组细胞功能实验的结果,探究 CMTM4 在脓毒症中对 T 细胞免疫功能的影响。分泌功能按照受抗原刺激后辅助性 T 细胞亚群可分化出 Th1 和 Th2 亚群,两者分泌的代表性细胞因子分别为 IL-2 和 IL-10,遂选择这两种典型细胞因子来检测 T 淋巴细胞分泌功能。结果证明 CMTM4 在脓毒症中对 T 淋巴细胞功能具有负向调节的作用,CMTM4 表达升高将抑制 T 细胞功能,表现为抑制增殖、促进凋亡、改变细胞生长周期比例、抑制分泌 IL-2 和 IL-10。以上实验结果基本可以证实最初的猜想是正确的,CMTM4 不仅在肿瘤细胞免疫逃逸中具有影响,还在脓毒症免疫抑制中起到一定作用。本课题目前仅通过 siRNA 下调 T 细胞 CMTM4 基因探究 CMTM4 对 T 细胞的影响,后续研究将通过腺病毒转染 Jurkat T 淋巴细胞,上调 CMTM4 基因,再对 T 细胞功能进行检测。

在作用机制方面,Mamessier 等人^[71]指出 CMTM4 与 CMTM6 具有 55%的同源性,遂两者发挥抑制作用的机制相类似,在肿瘤领域里 CMTM4 和 CMTM6 通过降低细胞表面 MHC-I 类分子的表达水平,在不影响抗原提呈的情况下,增强了细胞膜上组成性和诱导性 PD-L1 的表达,增强 PD-1/PD-L1 相互作用,在蛋白水平抑制 PD-L1 发生泛素化,延长其半衰期,促进 T 细胞凋亡、抑制 T 细胞免疫活性。同时 PD-L1 也是脓毒症免疫抑制的关键基因^[72],由此可以提出猜想——CMTM4 在脓毒症环境中亦可调节 PD-L1 分子从而影响 T 细胞数量及功能。本研究的局限性在于,尚未对 CMTM4 在脓毒症模型中是否通过 PD-1/PD-L1 介导 T 淋巴细胞损伤进行验证及深入研究,另外,对于 CMTM4 分子影响 LPS 刺激 T 细胞的增殖、凋亡、周期和分泌功能的信号通路机制,本研究未进行细致深入的探讨,这些内容将在后续自己的研究中逐步探索,同时也希

望能为其他研究者们提供参考及新的思路。

3.6 结论与展望

结论：

本部分研究以脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞和 Jurkat 淋巴细胞为研究对象，探讨 CMTM4 在脓毒症中的表达及对 T 细胞功能的影响，结论如下：

(1) CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞中的表达情况

与对照组相比，CMTM4 在脓症患者外周血 T 淋巴细胞和 LPS 刺激后的 T 淋巴细胞中表达量升高。

(2) CMTM4 对脓毒症 T 淋巴细胞功能的影响

CMTM4 可抑制 T 淋巴细胞增殖活性；影响细胞生长周期，使其阻滞于 G2/M 期；促进脓毒症 T 淋巴细胞发生凋亡；抑制细胞分泌 IL-2 和 IL-10 的功能。综上所述，CMTM4 对脓毒症 T 淋巴细胞具有负向调控作用，抑制 T 淋巴细胞免疫功能。

展望：

本实验仅对 CMTM4 在脓毒症 T 淋巴细胞的表达情况和功能影响进行初步的对比研究，并未深入探讨其作用机制，是否在脓毒症疾病模型下也符合 Mezzadra 和 Burr 两个团队的研究结论——CMTM4 与 PD-L1 具有协同作用，CMTM4 高表达延长 PD-L1 半衰期^[40,48]——还需进一步深入研究，相关信号通路也将在后续研究中进行。且 T 淋巴细胞包含多个亚群，各自功能不同，本实验并未对 T 淋巴细胞进行分群研究，希望本实验结果可为其他研究人员提供新思路、起到抛砖引玉的作用。

第四章 CMTM4 在脓毒症小鼠外周免疫器官中的表达

4.1 实验材料

4.1.1 主要试剂和材料

名称	生产厂家
TRIzol 裂解液	ThermoFisher
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	TOYOBO
SYBR Green Realtime PCR Master Mix	TOYOBO
BCA 蛋白定量试剂盒	索莱宝
聚偏二氟乙烯膜 (PVDF)	Millipore
硝酸纤维素膜 (NC)	Millipore
CMTM4 Antibody	Immunoway
CMTM4 Antibody (ICC 用)	Abcam
β -actin Antibody	Proteintech
辣根酶标记山羊抗兔 IgG	Proteintech
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG	索莱宝
RIPA 裂解液	索莱宝
磷酸酶抑制剂	索莱宝
5×Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液	索莱宝
10×电转移缓冲液	索莱宝
10×TBST 缓冲液	索莱宝
脱脂奶粉	新赛美
ECL 化学发光检测试剂盒	索莱宝
彩虹蛋白 Marker	索莱宝
5×蛋白上样缓冲液 (含 DTT)	索莱宝
SDS-PAGE 预制胶 CCK-8 试剂	索莱宝
台盼蓝溶液	Sigma
脂多糖 (LPS)	索莱宝
Mouse IL-6 ELISA KIT	索莱宝
1×PBS 缓冲液	索莱宝
DEPC 水	Coming

培养皿、培养板、离心管	Thermo
qPCR 96 孔板	Axygen
1.5ml 离心管	Axygen
无菌吸头	Corning
移液管 (1ml、5ml、10ml)	Corning
冻存管	Corning
酶标板	索莱宝
一次性巴氏德吸管	索莱宝
电转厚滤纸	永泰兴成
Western 洗膜盒	索莱宝
冻存盒	华康卫材
医用手术非吸收缝合线 (4-0#)	LEICA
LEICA819 刀片	纽约世联
眼科剪、眼科镊、持针器	

其余试剂如氯仿、异丙醇、甲醇、无水乙醇等均为国产试剂。所有试剂均按要求分装、储存，在保质期内按要求使用。

4.1.2 主要仪器

名称	生产厂家
移液枪 (2.5 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l)	Eppendorf
iMark 酶标仪	Bio-Rad
多功能酶标仪	BioTek
FACS Verse 流式分析仪	BD
超净工作台	北京长城
5810R 台式离心机	Eppendorf
2-16K 型低温高速离心机	Sigma
GS-15R 型离心机	Beckman
PCR 扩增仪	Biometra
实时定量 PCR 仪	Agilent
化学发光成像仪	Alpha Innotech
垂直板蛋白电泳装置	Bio-Rad
蛋白质湿式电转移装置	Bio-Rad
-20 $^{\circ}$ C低温冰箱	Haier
-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱	Haier

MZ7.5 普通光学显微镜	Leica
Nano 超微量紫外分光光度仪	Thermo
制冰机 SIM-F121	Sanyou
电热恒温水槽 DK-8D 型	上海一恒
BS300S-WE1 型电子天平	赛多利思

所有仪器均定期检测和校准。

4.1.3 实验动物及标本

选用 60 只 C57BL/6 雄性 SPF 级小鼠，8-10 周龄，体重 22-26 g（经医院动物室统一订购于北京维通利华实验动物有限公司）。我院有专门供动物订购、饲养、实验操作的动物室，为课题提供所需的动物及实验环境。小鼠饲养于无特殊病原菌、温度 22-25℃、湿度 40%、自然昼夜光线交替照射的环境中，以标准棒状饲料喂养，自由饮用水。本课题中所有实验过程均符合北京大学人民医院实验动物管理委员会规定。

通过盲肠结扎穿孔法（cecal ligation and puncture, CLP）制备脓毒症小鼠模型，根据实验设计在一定时间后处死小鼠，眼球取血留取静脉血样本，再分离小鼠外周免疫器官脾、腹腔淋巴结组织备用。静脉血静置后离心取血清用于 ELISA 检测；组织短期保存于 -20℃，长期保存于 -80℃。

4.2 实验方法

4.2.1 小鼠脓毒症模型的构建及标本取材

小鼠脓毒症模型采用 CLP 法进行构建^[73,74]。实验分组设置为实验组（CLP 组）和对照组（假手术组），实验组分为 6h、12h 和 24h 组，每组 5 只小鼠，具体步骤如下：①采用异氟烷吸入法麻醉小鼠，将麻醉好的小鼠取仰卧位固定在手术板上，按实验设计方案编号做标记。②用推毛器给小鼠腹部剃毛，腹部常规酒精消毒 2 次，注意无菌操作。③腹部正中作 1.0cm-1.5cm 切口，逐层开腹，将盲肠远端与肠系膜分离，游离盲肠。为了防止损伤血管及腹腔内脏器，此过程操作需小心。④用 4-0 丝线结扎距盲肠末端 3/4 处，使脓毒症小鼠病情较重。⑤25G 针头（10ml 注射器配套针头）在结扎端贯通穿刺一次，挤出小米粒大小盲肠内容物，置回腹腔。⑥由于术中有失液，术后立即腹腔注射温生理盐水 1ml，再逐层缝合腹壁，待小鼠苏醒后放回笼内，继续于 SPF 级环境中常规饲养，给予正常饮食。假手术组不进行盲肠结扎和穿孔，只进行开腹、关腹，其他操作同上。

按照实验设计分别在 CLP 造模后 6h、12h、24h 后处死各组小鼠，取小鼠内眦静脉血于 1.5 毫升离心管中，室温静置 2 小时后离心分离血清备用。分离小鼠外周免疫器

官脾、腹腔淋巴结组织备用，组织短期保存于-20℃，长期保存于-80℃。

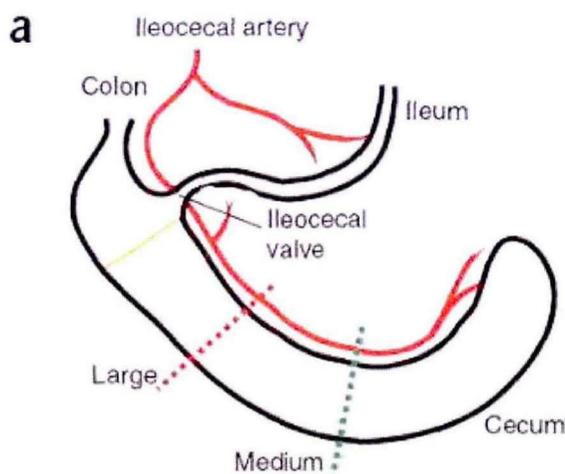


图 4.1 小鼠盲肠结扎解剖位置图 绿色虚线代表中等严重程度脓毒症模型，红色虚线代表重度脓毒症模型^[73]

4.2.2 Trizol 法提取组织总 RNA 与 cDNA 合成

(1) 提取组织总 RNA

①新鲜组织放入预冷EP管中，每50-100mg组织中加入1ml Trizol (ThermoFisher, 美国)，在冰上用研磨棒研磨，放于-20℃冰箱内过夜。②取出解冻后，4℃ 12000g离心10分钟。将上清液转移至干净EP管中，15-30℃环境孵育5分钟。③管中加入0.2ml氯仿，盖上盖子，剧烈震荡15s，室温孵育2-3分钟。4℃ 12000g离心15分钟，上层水相中为液态RNA。④取上层液体至干净EP管中，加入0.6ml异丙醇（每1ml Trizol）沉淀其中的RNA，上下颠倒混匀5次以上，室温孵育10分钟。4℃离心12000g，10分钟，即可在试管底部见到白色沉淀，即RNA。⑤弃上清，用1ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀，涡旋振荡混匀1-2s，4℃ 7500g，离心10分钟。小心倒弃乙醇，将RNA沉淀在室温中晾干5-10分钟。⑥55-60℃预热DEPC水，取20-50μL DEPC水溶解RNA沉淀，移液枪吹打数次。⑦用NanoDrop仪检测RNA浓度。

(2) 逆转录合成 cDNA

方法同 3.2.3 (2) 部分

4.2.3 RT-qPCR 检测 CMTM4 基因表达

所用试剂与步骤同 3.2.4。qPCR 小鼠引物见下表 4.1

表 4.1 qPCR 小鼠引物序列

目的基因	引物序列
mCMTM4 Forward	CAAGGTCGCCCAAGTGATTCT
mCMTM4 Reverse	GATTCCAGTTGATCTGGGGGA
m β -actin Forward	GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG
m β -actin Reverse	CAAGGTCGCCCAAGTGATTCT

4.2.4 Western Blot 检测 CMTM4 蛋白表达

(1) RIPA 裂解液提取蛋白

对于组织样品步骤如下：①组织剪切成细小的碎片，按照每 20mg 组织加入 150-250 μ l 裂解液的比例加入裂解液（含 1%蛋白酶抑制剂和 1%磷酸酶抑制剂），吹打混匀。②4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育 30-40min，使细胞充分裂解。③将裂解后的样品 10000-14000g 离心 20-30 分钟，取上清备用。长期保存于 -80 $^{\circ}$ C。

(2) (3) BCA 测定蛋白浓度和 Western Blot 电泳步骤同 3.2.5

4.2.5 免疫组化检测小鼠免疫器官中 CMTM4 表达量

对组织进行石蜡包埋、切片，将石蜡切片脱蜡至水后进行如下操作：①修复抗原：修复盒内放入 EDTA 抗原修复缓冲液 (PH8.0)，放入石蜡切片，于微波炉内中高火 9 分钟至沸腾，中止 7 分钟保温，再中低档加热 7 分钟，室温冷却，将玻片置于 PBS 中，摇床晃动洗涤 3 次，每次 5 分钟。②阻断内源性过氧化物酶：切片放入盛有 3%双氧水溶液的湿盒中，室温避光孵育 25 分钟，将玻片置于 PBS 中，摇床晃动洗涤 3 次，每次 5 分钟。③封闭：胶圈出组化圈，其内滴加 3%BSA 均匀覆盖组织部分，室温封闭 30 分钟。④孵育一抗：轻甩封闭液，在玻片上滴加稀释好的一抗，水平放于湿盒内，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。⑤孵育二抗：将玻片置于 PBS 中，摇床晃动洗涤 3 次，每次 5 分钟。稍甩干后在圈内滴加二抗 (HRP 标记)，室温孵育 50-60 分钟。⑥显色：将玻片置于 PBS 中，摇床晃动洗涤 3 次，每次 5 分钟。稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液，利用显微镜观察，控制显色时间，棕黄色部分为阳性结果，自来水冲洗切片及时终止显色。⑦复染胞核：苏木素复染 3 分钟左右流水冲洗，苏木素分化液分化数秒后流水冲洗，苏木素返蓝液返蓝流水冲洗。⑧脱水封片：将切片依次放入 75%酒精、85%酒精、无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I，各放置 5 分钟，脱水至透明，将切片拿出晾干，中性树胶封片。

4.2.6 ELISA 法检测小鼠血清 IL-6 浓度

(1) 分离小鼠血清:

选用 Mouse IL-6 ELISA KIT 试剂盒 (货号: SEKM-0007) 检测小鼠血清中炎症因子 IL-6 水平。眼球取血约 1.5ml 收集于 EP 管中, 室温静置 40min, 4°C 1000g 离心 10 min, 然后将上清分装于 1.5ml 管并于 -80°C 冰箱内保存 (若 24 小时内检测可暂时放入 4°C 冰箱储存), 血清应避免反复冻融。

(2) IL-6 检测:

步骤: ①提前拿出试剂盒使试剂恢复至室温, 加入标准品及样本前先洗 3 次板子并充分甩干。②反应孔中加入 100 μ l 样本与标准品, 封板, 放至 37°C 孵箱孵育 90min, 随后拍板、洗板各 4 次。③反应孔中加入 100 μ l 生物素化抗体工作液, 封板, 于 37°C 孵育 60 min 后拍板、洗板各 4 次。④反应孔中加入 100 μ l 酶结合物工作液, 封板后于 37°C 孵育 30min, 拍板、洗板各 5 次。⑤随后加入 100 μ l 显色底物, 封板后于 37°C 避光显色 15min。⑥加入 50 μ l 终止液, 保证 5 分钟内用酶标仪测定波长在 450nm 处的 OD 值, 绘制标准曲线, 求出血清中 IL-6 浓度。

4.3 统计学方法

动物实验重复至少三次, 实验各组每组至少 5 只小鼠, 其他实验独立重复三次, 所得实验数据均纳入统计中, 每次实验设置三个或以上重复孔, 取重复孔均值统计。采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行分析处理及作图。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 进行统计描述; 符合正态分布的计量资料采用 t 检验分析是否存在显著性差异, 非正态分布采用秩和检验; 当多组之间进行比较时采用单因素方差分析。定性资料采用 χ^2 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。ns 代表无显著性差异; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001。

4.4 实验结果

4.4.1 检验 CLP 法制备小鼠脓毒症模型效果

依据既往文献, 分别从小鼠体态、行为变化及外周血 IL-6 水平检验小鼠脓毒症模型制备效果^[74,75]。

与对照组相比, 6h 组小鼠外观变化并不明显, 仅有行动缓慢的现象, 而 12h 和 24h 组体态及行为变化较为显著, 出现精神萎靡、活动减少、痛苦面容, 大多数小鼠蜷缩于一处, 毛发极易脱落, 眼球处可渗出白色脓液, 抓取时失去反抗行为, 躯体出现震颤, 伴有臭味, 严重者出现死亡。

另外, 取各组存活小鼠外周静脉血分离血清(每组 5 只小鼠), ELISA 法检测血清中 IL-6 水平以判断小鼠炎症程度。实验结果显示, sham 组 IL-6 浓度为 (76.17 ± 16.64) pg/ml, 6h、12h 和 24h 组 IL-6 浓度依次为 (130.80 ± 30.15) pg/ml、 (289.10 ± 32.22) pg/ml、 (289.40 ± 49.35) pg/ml, 与假手术 sham 组相比, 脓毒症组促炎因子 IL-6 在 6h、12h、24h 三个时间点均升高, 以 12h 和 24h 最为明显 ($P < 0.05$), 具有显著性差异, 可以说明脓毒症小鼠均存在不同程度炎症反应, CLP 造模成功。见图 4.2。

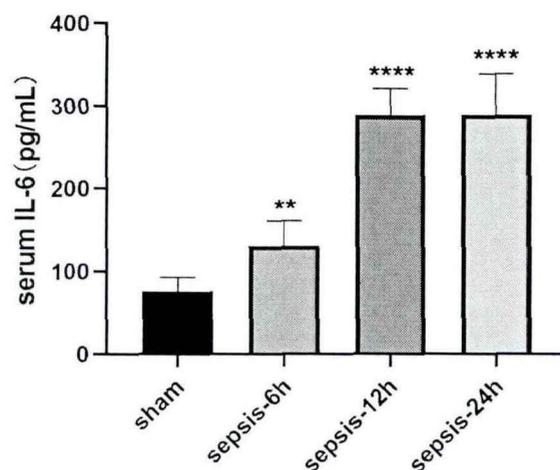


图 4.2 ELISA 法检测小鼠血清 IL-6 浓度。每次实验每组设置小鼠 5 只, 共进行 3 次独立重复实验, 统计结果为脓毒症 6h、12h、24h 组各自与假手术组相比。** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$

4.4.2 脓毒症小鼠外周免疫器官中 CMTM4 表达量升高

CLP 造模后分别于 6、12、24 小时处死对应组小鼠(每组 5 只小鼠), 取脾、腹腔淋巴结部分组织, 分成三部分分别用于后续提取总 RNA、提取蛋白和免疫组化实验。通过 RT-qPCR 的方法检测小鼠组织中 CMTM4 的表达, 结果显示, 在脾组织中, 与假手术组相比, 脓毒症 12h 和 24h 组小鼠外周免疫器官中 CMTM4 基因在转录水平明显升高, 6h 组与假手术组无明显差异; 在腹腔淋巴结组织中, 6h 与 12h 组与假手术组均无明显统计学差异, 24h 组较假手术组显著升高, 结果如图 4.3 所示。同时通过 Western Blot 技术研究 CMTM4 在蛋白水平表达情况, 趋势基本同 qPCR 结果, 即脓毒症组与假手术组相比 CMTM4 表达升高, 24h 最为明显, 如图 4.4 所示。另外, 我们通过免疫组化对小鼠外周免疫器官组织表达 CMTM4 情况进行观察, 选择炎症程度较为严重且 RT-qPCR 及 Western Blot 趋势最明显的 CLP 24h 组与假手术组进行免疫组化检测, 结果与之前数据较为符合, CMTM4 在 CLP 24h 组的表达较假手术组表达上调, 见图 4.5。

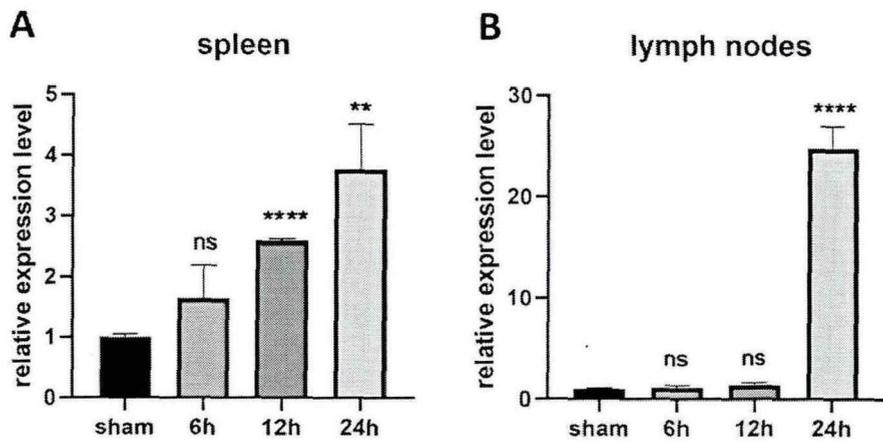


图 4.3 RT-qPCR 检测假手术组与脓毒症小鼠外周免疫组织中 CMTM4 表达变化。脓毒症 6、12、24h 组较假手术 Sham 组 CMTM4 表达均升高。A.脾脏中 CMTM4 表达；B.腹腔淋巴结 CMTM4 表达。每次实验每组 5 只小鼠，重复实验后取均值统计。ns 无显著性差异，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$

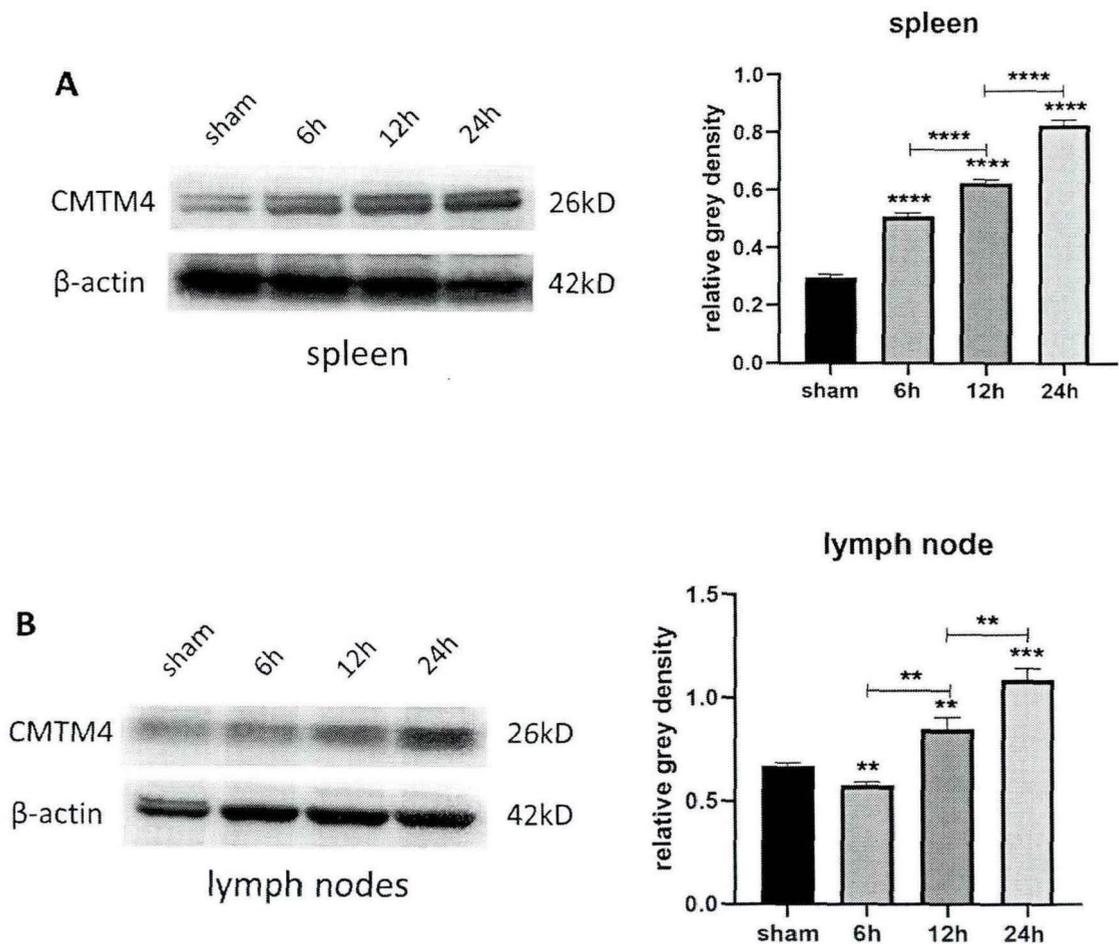


图 4.4 Western Blot 检测脓毒症小鼠外周免疫组织中 CMTM4 表达变化情况（每组 5 只小鼠）。脓毒症组较假手术组 CMTM4 表达升高，24h 升高最为明显。A.脾脏中的表达；B.腹腔淋巴结中的表达。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$

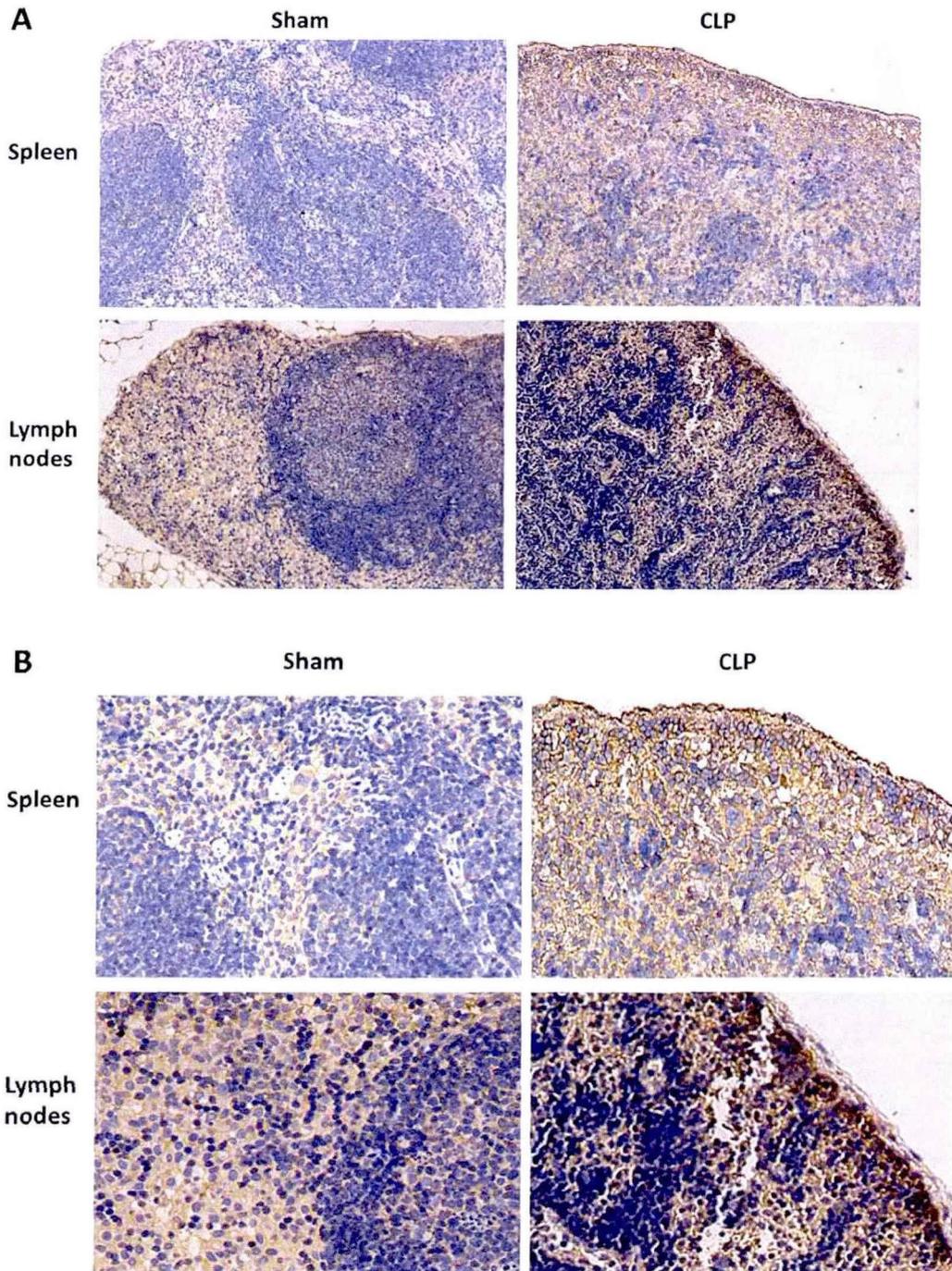


图 4.5 免疫组化观察假手术组与 24h 脓毒症组小鼠免疫组织中 CMTM4 表达变化情况。结果与 RT-qPCR 及 Western Blot 结果基本相符, 24h 脓毒症组较假手术组 CMTM4 表达升高。A. 200×光镜下图像; B. 200×光镜下视野放大 4 倍的图像, n=5

4.5 讨论

从第二部分实验结果来看, CMTM4 在脓毒症外周血 T 淋巴细胞中的表达与正常机体表达量相比明显升高, 且对 T 细胞免疫功能确有影响, 而外周免疫器官脾、淋巴

结是免疫细胞积聚、增殖的场所，是机体重要的外周免疫器官，两者在机体启动、维持免疫应答反应中起到重要作用^[76,77]。遂本部分对外周免疫器官脾、淋巴结中 CMTM4 的表达情况进行研究，探究其是否与外周循环中的 T 细胞有着相同变化规律。参考现有文献，通过 CLP 法制备脓毒症小鼠模型，并分别从小鼠体态、行为变化及外周血中 IL-6 水平验证是否造模成功^[74,75]。确保造模成功后，实验分别在基因和蛋白水平进行检测，从 RT-qPCR、Western Blot 和免疫组化的实验结果中发现在小鼠脾、淋巴结中 CMTM4 的变化趋势与外周血中 T 淋巴细胞的变化相一致，脓毒症组较假手术组表达明显升高。

如前述，CMTM4 可延长 PD-L1 的半衰期从而使其与 PD-1 结合增加，促进凋亡发生，削弱淋巴细胞免疫功能。正常情况下，Tregs 仅占脾组织 CD4⁺T 细胞的 5%-10%，而脓毒症时机体发生过度炎症反应引起脾功能障碍，脾细胞的凋亡基因表达出现了差异表达，凋亡增加^[78]；外周淋巴结中情况类似。既往研究显示^[29]，脓毒症组和对照组的脾 T 淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 呈阳性，但脓毒症组水平明显升高；Scumpia 团队^[79]发现脓毒症小鼠脾内 Treg 细胞比例增加，且对 Teffs 的抑制作用更强。所以 CMTM4 表达水平升高与脓毒症脾功能受抑、淋巴结 T 细胞凋亡增加相符合。

本部分的局限性在于仅检测了脾和淋巴结中 CMTM4 的表达情况，未深入研究，下一步可对脾、淋巴结中的淋巴细胞进行分群研究，并研究其凋亡发生的信号通路，为临床开展脓毒症免疫治疗提供依据。

4.6 结论

与正常对照组相比，CMTM4 在脓毒症小鼠外周免疫器官脾、腹腔淋巴结中表达量升高。

第五章 淋巴细胞相关比值 NLR、PLR 预测脓毒症心肌损伤的临床价值

5.1 研究目的

探索淋巴细胞相关比值中性粒细胞/淋巴细胞比值 (neutrophil/lymphocyte ratio, NLR)、血小板/淋巴细胞比值 (platelet/lymphocyte ratio, PLR) 在预测脓症患者发生心肌损伤的临床价值。

5.2 研究方法

5.2.1 纳入标准与排除标准

研究对象选择自 2017 年 1 月至 2019 年 8 月收治于北京大学人民医院 ICU 的共计 142 例脓毒症确诊患者, 连续纳入并进行回顾性队列研究。纳入及排除标准参照以往大多脓毒症临床研究制定。

纳入标准: ①年龄 ≥ 18 周岁者; ②满足 Sepsis 3.0 诊断标准^[1];

排除标准: ①妊娠期; ②患有血液系统疾病、恶性肿瘤晚期、慢性肝肾功能不全者; ③接受化疗、糖皮质激素或免疫抑制剂治疗者; ④1 周内使用影响凝血功能及血小板聚集的药物; ⑤入院前短时间内有大量失血和 (或) 输血史者。

本研究获得北京大学人民医院伦理委员会批准 (伦理审批号: 2019PHB042-01)。

5.2.2 研究指标及实验分组

采集患者的一般资料 (性别、年龄、吸烟与否等)、既往病史 (有无基础疾病) 和入 ICU 诊断为脓毒症时的血常规指标 (白细胞计数、中性粒细胞绝对值、淋巴细胞绝对值和血小板绝对值), 计算比值 NLR、PLR; 记录心肌损伤标志物 (cTnI、BNP、CK-MB、肌红蛋白) 和炎性指标 (CRP、PCT), 记录入 ICU 24h 内急性生理和慢性健康状况评估量表 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II) 和 ICU 住院时间。根据 cTnI 反映的心肌损伤程度, 将患者分为非心肌损伤组 (cTnI < 0.034 ng/ml) 74 例和心肌损伤组 (cTnI ≥ 0.034 ng/ml) 68 例。

5.2.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。先进行正态性检验及方差齐性检验, 满足正态分布及方差齐的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 比较组间差异采用两独立样本 t 检验; 不满足正态分布、方差不齐的计量资料借助四分位数 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 采

用双独立样本非参数检验 (Mann-Whitney U 秩和检验) 比较差异。计数资料以百分率进行统计描述, 采用 χ^2 检验进行统计分析。采用 Spearman 相关性分析方法分别对 NLR 和 PLR 与心肌损伤标志物和炎性指标进行相关性分析。采用 Logistic 回归分析脓毒症发生心肌损伤的独立危险因素; 绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 评价两项指标对心肌损伤预测的价值。计算约登指数获得对应的灵敏度和特异度, 最大值时对应的点作为最佳临界点。 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

5.3 研究结果

5.3.1 心肌损伤组与非损伤组患者基线资料对比

共纳入 142 例脓症患者, 其中非心肌损伤组 74 例, 占 52.11%; 心肌损伤组 68 例, 占 47.89%。比较两组间性别、年龄、吸烟、基础疾病等基线资料, 各项指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。对比两组患者间炎症指标和心肌损伤标志物, 显示心肌损伤标志物各项均有显著性差异, 24h 内 APACHE II 评分亦有明显差异 ($P < 0.05$)。见表 5.1。

表 5.1 非心肌损伤组与心肌损伤组基线资料比较

指标	非心肌损伤组 (n=74)	心肌损伤组 (n=68)	t/ χ^2 值	P 值
性别 (例, %)				
男	43, 58.10	43, 63.24	0.390	0.532
女	31, 41.89	25, 36.76	0.390	0.532
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	62.93 \pm 2.16	65.90 \pm 8.45	-1.059	0.291
吸烟 (例, %)	23, 31.08	15, 22.06	1.472	0.537
基础疾病 (例, %)				
脑卒中	6, 8.11	10, 14.71	1.543	0.214
冠心病	10, 13.51	12, 17.65	0.462	0.496
高血压	25, 33.78	25, 36.76	0.138	0.710
心律失常	7, 9.45	6, 8.82	0.017	0.896
心力衰竭	1, 1.35	0, 0	0.925	0.336

糖尿病	15, 20.27	13, 19.12	0.030	0.863
高脂血症	1, 1.35	2, 2.94	0.433	0.510
肾功能异常	7, 9.46	5, 7.35	0.203	0.652
BNP ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)	318.55±42.99	1200.63±170.21	-5.306	<0.001*
CK-MB ($\bar{x} \pm s$, U/L)	1.70±0.27	9.61±0.48	-2.816	0.008*
肌红蛋白($\bar{x} \pm s$, μg/L)	170.33±61.53	494.97±107.05	-3.310	0.002*
CRP ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	135.23±13.65	122.09±13.37	0.914	0.362
PCT ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)	10.79±1.54	12.77±1.67	0.955	0.342
APACHE II 评分 ($\bar{x} \pm s$)	20.95±0.84	24.25±1.00	-3.054	0.003*
ICU 住院时间(\bar{x} ±s, d)	8.79±1.27	11.79±2.11	-1.695	0.877

* $P < 0.05$

5.3.2 对比 NLR 和 PLR 在心肌损伤组与非损伤组间的差异

与非心肌损伤组相比, 心肌损伤组 NLR 值明显升高, PLR 数值明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5.2。

表 5.2 非心肌损伤组与心肌损伤组 NLR、PLR 值比较 [M(P25, P75)]

指标	非心肌损伤组 (n=74)	心肌损伤组 (n=68)	Z 值	P 值
NLR	15.24 (8.87, 23.01)	63.87 (23.43, 83.51)	-6.154	<0.001*
PLR	380.68 (284.13, 498.74)	169.85 (97.74, 285.68)	-6.217	<0.001*

* $P < 0.05$

5.3.3 NLR、PLR 值与心肌损伤指标及炎症指标的相关性分析

Spearman 相关性分析显示, 在脓症患者中, NLR 与 CRP 呈正相关 ($r=0.604$, $P < 0.05$), 与肌红蛋白所对应的 r 值过低, 不具有相关意义; PLR 与 BNP、APACHE II 评分呈负相关 ($r = -0.884$, $r = -0.722$, $P < 0.05$)。见表 5.3。

表 5.3 脓症患者 NLR、PLR 与炎症和心肌损伤标志物相关性分析

指标	NLR		PLR	
	r 值	P 值	r 值	P 值
BNP	0.658	0.497	-0.884	0.029*
CK-MB	0.452	0.543	-0.697	0.252
肌红蛋白	0.187	0.04*	0.267	0.998
CRP	0.604	<0.001*	0.469	0.417
APACHE II 评分	0.560	0.500	-0.722	0.047*

* $P < 0.05$

5.3.4 Logistic 回归分析脓毒症患者发生心肌损伤的危险因素

Logistic 回归结果显示 NLR、PLR 同 APACHE II 评分一样，都是脓症患者发生心肌损伤的独立危险因素 ($P < 0.05$)，见表 5.4。

表 5.4 Logistic 回归分析脓症患者心肌损伤独立危险因素

指标	Wald 卡方值	P 值	OR 值	95%置信区间
NLR	4.237	0.046*	1.019	(1.001, 1.037)
PLR	2.808	0.044*	0.999	(0.997, 1.000)
APACHE II 评分	8.425	0.004*	1.070	(1.004, 1.139)
CRP	1.518	0.218	1.017	(1.001, 1.029)
PCT	0.927	0.336	1.021	(0.979, 1.064)

* $P < 0.05$

5.3.5 ROC 曲线探究 NLR 和 PLR 对脓毒症心肌损伤的预测价值

ROC 结果显示，NLR、PLR 对脓症患者心肌损伤均具有一定的预测价值 ($P < 0.05$)，AUC 分别为 0.799，0.750。NLR 最佳截断值为 37.71，预测灵敏度为 69.10%，特异度为 58.10% ($P < 0.001$)；PLR 最佳截断值为 588.74，预测灵敏度为 75.00%，特异度为 60.70% ($P < 0.001$)，见图 5.1 和表 5.5。

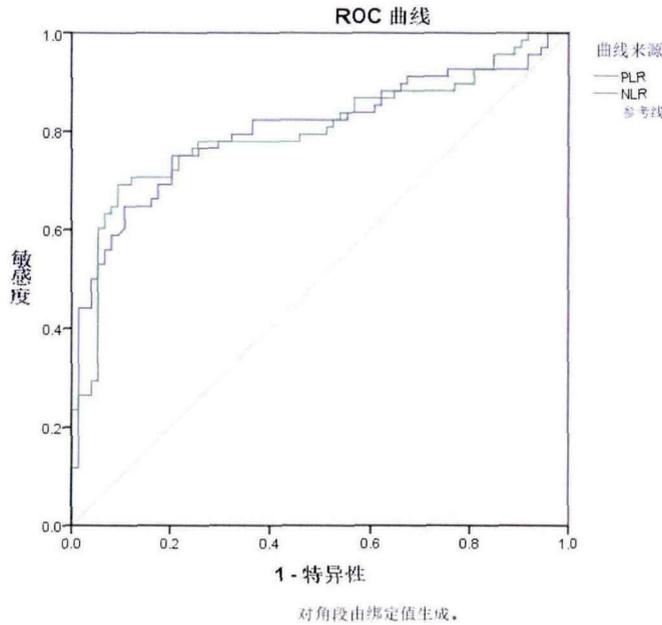


图5.1 NLR, PLR预测脓症患者心肌损伤ROC曲线

表 5.5 NLR、PLR 值对患者心肌损伤的预测价值

指标	AUC	最佳临界值	灵敏度	特异度	P 值	95%置信区间
NLR	0.799	37.71	0.691	0.581	<0.001*	(0.722, 0.877)
PLR	0.750	588.74	0.750	0.607	<0.001*	(0.726, 0.879)

* $P < 0.05$

5.4 讨论

脓毒症是 ICU 患者死亡的主要原因，起病急、进展快、死亡风险高，给各国医疗资源和患者家庭带来巨大压力，这就要求临床医生必须尽早诊断以给予早期充分治疗。严重感染后免疫细胞过度激活、炎症因子大量释放打破机体内环境稳态，激发炎症反应，若机体无法正常发挥免疫调理作用，促炎与抗炎反应失衡，即造成免疫紊乱和靶器官损害、功能衰竭^[59,80]，两者均为脓毒症发生过程中重要的病理生理机制，能否通过将两者之间相关联以提高诊断效能已成为许多临床研究关注的热点。心脏是脓毒症器官损害的主要靶器官，但脓毒症心肌损害的病理生理机制众说纷纭、尚未统一，也未明确脓毒症心肌病概念，临床医生在诊断时也只是依据传统心肌损伤指标来判断^[81]。由于脓毒症心肌损伤是基于严重炎症反应发生的，免疫与凝血功能紊乱、交互作用便是造成心肌损伤的重要环节。但是遗憾的是，目前少有研究人员将脓毒症免疫状态与器官损伤相关联，本研究将探索这两类指标对脓症患者心肌损害的预测价值。

在免疫功能方面，脓毒症初期固有免疫的先锋者中性粒细胞活化增多，促炎因子大量释放，免疫活化，但同时亦损伤靶器官；随之获得性免疫激活，淋巴细胞维持免疫平衡，在免疫抑制中扮演重要角色，而免疫抑制是造成患者预后差的主要机制^[67,82]。与此同时，在凝血功能方面，活化的血小板可通过表面分子和分泌相关因子影响机体炎性反应、参与免疫调节^[83]。可见，本研究涉及的淋巴细胞相关比值 NLR、PLR 将脓毒症发病过程中的炎性细胞中性粒细胞、淋巴细胞和血小板联系在一起，反映感染所致系统性炎症反应中免疫-免疫、免疫-凝血的关系。三者通过血常规结果计算得到，获取便捷经济，操作性强，有较高的临床研究价值。

NLR 代表中性粒细胞与淋巴细胞之间的相对数量关系。中性粒细胞为促炎细胞，迁移至心脏后分泌大量炎症因子及活性氧（reactive oxygen species, ROS）致心肌细胞坏死并影响心肌电活动，诱发心律失常^[84]，造成心肌损伤；另外，中性粒细胞分泌蛋白水解酶造成血管内皮损伤，激活凝血功能，形成微血栓堵塞血管，影响心肌灌注^[85]。而大量研究证实淋巴细胞受炎症刺激分化为 Tregs，分泌 IL-10 等抗炎细胞因子降低炎症反应^[86]；促进受损心肌和血管内皮细胞增殖、再生，在心血管损伤时具有保护作用^[87]。严重脓症患者免疫失衡，抑制为主，中性粒细胞过度激活合并大量淋巴细胞凋亡，对心血管保护作用大大减弱。Dragan 等人指出作为新型炎症指标的 NLR 在脓毒症死亡组中显著升高，对预后具有一定预测能力（AUC/ROC 为 0.681， $p < 0.05$ ）^[88]，这与本研究得到的结论相符合，通过本实验数据可以发现，脓毒症心肌损伤组 NLR 值较正常组显著增高，NLR 可作为心肌损伤发生的独立危险因素，具有一定预测价值。由此，NLR 值升高时，炎症反应增强，发生心肌损伤、导致脓毒症心肌病的可能性增加。

PLR 作为血小板与淋巴细胞的比值，将机体免疫与凝血功能联系在一起，目前也被认作系统性炎症反应标记物^[89]。既往研究证明血小板参与脓毒症炎症放大过程，诱导中性粒细胞分泌 TNF- α 等炎症因子，攻击心肌细胞造成组织水肿并促进心肌细胞凋亡^[90]。而全身炎症反应后期血小板消耗增多、骨髓内巨核细胞成熟减少，导致血小板计数降低，造成器官功能障碍，持续低下预示患者预后较差^[91]。本研究发现，与脓毒症心肌正常组相比，损伤组 PLR 明显降低，与 BNP 呈负相关性，是发生心肌损害的独立危险因素。通过本研究证明 PLR 降低提示可能存在心肌损伤，但血小板和淋巴细胞计数均降低，究竟哪一项影响更大，可能需要进行大样本实验进一步验证。

但是同时，本研究存在一定局限性。本研究为单中心回顾性研究，病例数较少；此外，ICU 住院患者病情较重，合并疾病多，感染情况往往更为复杂，在今后的研究纳入病例时应多加关注及控制感染来源、感染严重程度、病原体种类等混杂因素。

5.5 结论及展望

结论:

通过本临床研究可知,较脓毒症非心肌损伤组相比,淋巴细胞相关比值 NLR、PLR 在心肌损伤患者中确有显著性差异, NLR、PLR 与心肌损伤标志物存在相关性,且对脓毒症患者发生心肌损伤均具有一定的预测价值。

展望:

本课题仅针对 NLR、PLR 对脓毒症心肌损伤的预测价值,后续可扩展至分析两种比值对于脓毒症其他重要靶器官急性损伤的临床价值;亦可对单独与联合指标各自预测脓毒症结局的效果进行研究。

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.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, 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.
- [4] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(12): 862-874.
- [5] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, et al. Host innate immune responses to sepsis[J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 36-44.
- [6] Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, et al. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression[J]. *Nat Med*, 2009, 15(5): 496-497.
- [7] Inoue S, Sato T, Suzuki-Utsunomiya K, et al. Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice[J]. *Shock*, 2013, 39(3): 311-316.
- [8] Luan YY, Yao YM, Sheng ZY Update on the immunological pathway of negative regulation in acute insults and sepsis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2012, 32(7): 288-298.
- [9] Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 72(6): 1491-1501.
- [10] Clere-Jehl R, Mariotte A, Meziani F, et al. JAK-STAT Targeting Offers Novel Therapeutic Opportunities in Sepsis[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(11): 987-1002.
- [11] Takeuchi O, Akira S Pattern recognition receptors and inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [12] Raymond SL, Holden DC, Mira JC, et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(10 Pt B): 2564-2573.
- [13] Zanotti S, Kumar A, Kumar A Cytokine modulation in sepsis and septic shock[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11(8): 1061-1075.
- [14] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(5): 517-528.
- [15] Angus DC, van der Poll T Severe sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(9): 840-851.
- [16] Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, et al. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(4): 224-233.
- [17] den Haan JM, Arens R, van Zelm MC The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells[J]. *Immunol Lett*, 2014, 162(2 Pt B): 103-112.
- [18] Huo R, Wang L, Wang X, et al. Removal of regulatory T cells prevents secondary chronic infection

- but increases the mortality of subsequent sub-acute infection in sepsis mice[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10962-10975.
- [19] Rendon JL, Choudhry MA Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(3): 529-538.
- [20] Schneider DF, Glenn CH, Faunce DE Innate lymphocyte subsets and their immunoregulatory roles in burn injury and sepsis[J]. *J Burn Care Res*, 2007, 28(3): 365-379.
- [21] Sandler M, van den Brandt C, Glaubitz J, et al. NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(1): 253-269.e214.
- [22] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. *Cell*, 2008, 133(5): 775-787.
- [23] Flohé SB, Agrawal H, Schmitz D, et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79(3): 473-481.
- [24] Christaki E, Anyfanti P, Opal SM Immunomodulatory therapy for sepsis: an update[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9(11): 1013-1033.
- [25] Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, et al. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis[J]. *Crit Care*, 2008, 12(5): R128.
- [26] Schwulst SJ, Muenzer JT, Peck-Palmer OM, et al. Bim siRNA decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis[J]. *Shock*, 2008, 30(2): 127-134.
- [27] Doughty L Adaptive immune function in critical illness[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2016, 28(3): 274-280.
- [28] Shiao SL, McNiff JM, Pober JS Memory T cells and their costimulators in human allograft injury[J]. *J Immunol*, 2005, 175(8): 4886-4896.
- [29] Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure[J]. *JAMA*, 2011, 306(23): 2594-2605.
- [30] Yi JS, Cox MA, Zajac AJ T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion[J]. *Immunology*, 2010, 129(4): 474-481.
- [31] Han W, Ding P, Xu M, et al. Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation[J]. *Genomics*, 2003, 81(6): 609-617.
- [32] Han W, Lou Y, Tang J, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity[J]. *Biochem J*, 2001, 357(Pt 1): 127-135.
- [33] Wu K, Li X, Gu H, et al. Research Advances in CKLF-like MARVEL Transmembrane Domain-containing Family in Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2576-2583.
- [34] Downing TE, Oktay MH, Fazzari MJ, et al. Prognostic and predictive value of 16p12.1 and 16q22.1 copy number changes in human breast cancer[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 198(1): 52-61.
- [35] Fu L, Dong SS, Xie YW, et al. Down-regulation of tyrosine aminotransferase at a frequently deleted region 16q22 contributes to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1624-1634.

- [36] Zhang H, Zhang X, Yuan X, et al. MicroRNA-205 inhibits renal cells apoptosis via targeting CMTM4[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(10): 1020-1026.
- [37] 查鹏, 王俊 食管、贲门癌组织中 CMTM4、8 的表达及意义[J]. *山东医药*, 2009, 49: 21-22.
- [38] Sánchez-Pulido L, Martín-Belmonte F, Valencia A, et al. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events[J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(12): 599-601.
- [39] Chrifi I, Louzao-Martinez L, Brandt MM, et al. CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions[J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1): 75-93.
- [40] Mezzadra R, Sun C, Jae LT, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators[J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 106-110.
- [41] Plate M, Li T, Wang Y, et al. Identification and characterization of CMTM4, a novel gene with inhibitory effects on HeLa cell growth through inducing G2/M phase accumulation[J]. *Mol Cells*, 2010, 29(4): 355-361.
- [42] Xue H, Li T, Wang P, et al. CMTM4 inhibits cell proliferation and migration via AKT, ERK1/2, and STAT3 pathway in colorectal cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(9): 915-924.
- [43] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 363-366.
- [44] Zheng L, Liu J, Batalov S, et al. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(1): 135-140.
- [45] Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division[J]. *Nature*, 2004, 432(7020): 1036-1040.
- [46] Li T, Cheng Y, Wang P, et al. CMTM4 is frequently downregulated and functions as a tumour suppressor in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 122.
- [47] Bei C, Zhang Y, Wei R, et al. Clinical significance of CMTM4 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 5439-5443.
- [48] Burr ML, Sparbier CE, Chan YC, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 101-105.
- [49] Bousiotis VA Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(18): 1767-1778.
- [50] Danilova L, Wang H, Sunshine J, et al. Association of PD-1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(48): E7769-e7777.
- [51] Liu F, Liu X, Liu X, et al. Integrated Analyses of Phenotype and Quantitative Proteome of CMTM4 Deficient Mice Reveal Its Association with Male Fertility[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(6): 1070-1084.
- [52] Zhao W, Zhao F, Yang K, et al. An immunophenotyping of renal clear cell carcinoma with characteristics and a potential therapeutic target for patients insensitive to immune checkpoint blockade[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13330-13341.
- [53] Conway-Morris A, Wilson J, Shankar-Hari M Immune Activation in Sepsis[J]. *Crit Care Clin*, 2018, 34(1): 29-42.

- [54] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87.
- [55] Weng L, Zeng XY, Yin P, et al. Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(7): 1071-1080.
- [56] Delano MJ, Ward PA The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome[J]. *Immunol Rev*, 2016, 274(1): 330-353.
- [57] Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, et al. Danger signals activating the immune response after trauma[J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 315941.
- [58] Grimaldi D, Llitjos JF, Pène F Post-infectious immune suppression: a new paradigm of severe infections[J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(10): 455-463.
- [59] Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research[J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(12): e422-e436.
- [60] Assinger A, Schrottmaier WC, Salzmann M, et al. Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1687.
- [61] Mandaliya H, Jones M, Oldmeadow C, et al. Prognostic biomarkers in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC): neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte to monocyte ratio (LMR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and advanced lung cancer inflammation index (ALI)[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(6): 886-894.
- [62] Zhao C, Wei Y, Chen D, et al. Prognostic value of an inflammatory biomarker-based clinical algorithm in septic patients in the emergency department: An observational study[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106145.
- [63] Acet H, Ertaş F, Akıl MA, et al. Relationship Between Hematologic Indices and Global Registry of Acute Coronary Events Risk Score in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2016, 22(1): 60-68.
- [64] Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 762-768.
- [65] Martin L, Derwall M, Al Zoubi S, et al. The Septic Heart: Current Understanding of Molecular Mechanisms and Clinical Implications[J]. *Chest*, 2019, 155(2): 427-437.
- [66] Wilson JK, Zhao Y, Singer M, et al. Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis - pilot study[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 95.
- [67] Qiu Y, Tu GW, Ju MJ, et al. The Immune System Regulation in Sepsis: From Innate to Adaptive[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(8): 799-816.
- [68] Condotta SA, Khan SH, Rai D, et al. Polymicrobial Sepsis Increases Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8+ T Cell Exhaustion[J]. *J Immunol*, 2015, 195(1): 116-125.
- [69] Naqvi SA, Thompson GC, Joffe AR, et al. Cytokines and Chemokines in Pediatric Appendicitis: A Multiplex Analysis of Inflammatory Protein Mediators[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 2359681.
- [70] Faix JD Biomarkers of sepsis[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(1): 23-36.
- [71] Mamessier E, Birnbaum DJ, Finetti P, et al. CMTM6 stabilizes PD-L1 expression and refines its prognostic value in tumors[J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(3): 54.
- [72] Shindo Y, McDonough JS, Chang KC, et al. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis[J]. *J*

Surg Res, 2017, 208: 33-39.

- [73] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [74] Mishra SK, Choudhury S Experimental Protocol for Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis and Assessment of Vascular Functions in Mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1717: 161-187.
- [75] Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?[J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19(4): 198-208.
- [76] Mebius RE, Kraal G Structure and function of the spleen[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(8): 606-616.
- [77] Cesta MF Normal structure, function, and histology of the spleen[J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(5): 455-465.
- [78] Lelubre C, Vincent JL Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 417-427.
- [79] Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, et al. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis[J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7943-7949.
- [80] Perner A, Rhodes A, Venkatesh B, et al. Sepsis: frontiers in supportive care, organisation and research[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(4): 496-508.
- [81] Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 112.
- [82] 吴田田, 姚咏明 脓毒症免疫紊乱及其临床意义[J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42(02): 95-102.
- [83] 曹钰, 邓颖, 方邦江等 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. *感染、炎症、修复*, 2019, 20(01): 3-22.
- [84] Singh R, Devi S, Gollen R Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(2): 113-126.
- [85] Park JS, Seo KW, Choi BJ, et al. Importance of prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(48): e13471.
- [86] Frangogiannis NG Regulation of the inflammatory response in cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [87] Sreejit G, Abdel-Latif A, Athmanathan B, et al. Neutrophil-Derived S100A8/A9 Amplify Granulopoiesis After Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2020, 141(13): 1080-1094.
- [88] Saliccioli JD, Marshall DC, Pimentel MA, et al. The association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in critical illness: an observational cohort study[J]. *Crit Care*, 2015, 19(1): 13.
- [89] Ying HQ, Deng QW, He BS, et al. The prognostic value of preoperative NLR, d-NLR, PLR and LMR for predicting clinical outcome in surgical colorectal cancer patients[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 305.
- [90] 林靖, 陈欣, 黄志民等 应激性心肌损伤发病机制的实验研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2012,

24(4): 207-210.

[91] 叶云燕, 王艺沙, 范成美等 血清 PCT 与 CRP 和血小板对重症感染患者病情程度的评估效果研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(10): 1487-1490.

致谢

花开花落又一年，紧张充实的研究生学习转眼接近尾声，回顾三年经历有太多不易，令人百感交集，这段经历是我人生中非常重要的一场磨炼，让我成长催我奋进，一路走来，有太多人需要感谢，此刻脑海中不断浮现出一张张亲切的面孔，内心充盈满满的感激……

首先要感谢我的导师朱凤雪教授，她求真严谨的治学态度、创新务实的工作精神都对我未来的成长产生积极而深远的影响，她用渊博的知识和敏锐的思维引我走进重症医学领域，诠释了师者传道授业解惑，培养我的科研能力，提升我的专业水平，在繁忙的工作之余不忘定期督促课题进展，组会上细致的指导建议让我茅塞顿开。我的硕士论文从选题、构思到资料收集，每一环节都倾注了导师大量的心血。师恩难忘，唯用心铭记！

同时要感谢赵秀娟老师、李纾老师和王振洲老师，特别要感谢赵秀娟老师在生活上对我的关心、照顾以及在科研和临床方面对我的督促与指导，是他们亦师亦友的支持与帮助带我逐渐走出低谷，重新回到阳光里，克服困难，在实现梦想的道路上继续前行。谨向三位老师表示最诚挚的谢意。

感谢郭辅政师兄、蒋丽蕾师姐、薛海岩师姐、解鹏师弟在临床与科研方面的悉心指导与帮助，让我不断开拓科研思路，增长见识。感谢科研楼 902 实验室全体老师和师兄，特别是肝胆外科朱继业主任、李照老师、于馨老师、汪洋老师和程倩老师，为我们提供良好的实验环境，创造优渥的科研条件，让我得以顺利开展实验。另外还要感谢人民医院教育处高书春老师和徐焱老师给予我的帮助。感谢北大人民医院为我提供了这么好的平台，这么多优秀的资源，让我有所依托，帮我实现梦想。

要特别感谢父母和家人多年来默默奉献与无微不至的呵护，他们的爱让我全心全意专注于学业，爸爸妈妈永远是我人生路上最坚强的后盾！感谢 748 宿舍三位可爱的舍友李佳睿、欧阳倩如和许欣的朝夕陪伴，是你们让我时刻感受到家的氛围，日常生活中点点滴滴的关爱让我内心无比温暖。其他未能一一提及的各位同学和朋友也在此一并致谢，感谢你们的无私帮助！

本课题得益于学校和医院各方面的支持，今后我会努力将所学运用于工作，以己之能回报社会，回报所有帮助我的人们。本论文在写作过程中借鉴引用了学界的一些研究成果，在此谨向原创者表示由衷的敬意和诚挚的谢意！

最后，我要真诚地致敬于百忙中评审论文的各位专家教授，感谢你们的辛勤工作，希望这篇拙作能够抛砖引玉，为基础医学和临床医学研究贡献微薄之力。

北京大学学位论文原创性声明和使用授权说明

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：

王雅心

日期：2021年5月1日

学位论文答辩委员会名单

论文题目	CMTM4 在脓毒症 T 细胞中的表达与功能及淋巴细胞相关比值 预测脓毒症心肌损伤的临床价值			
作 者	王雅心			
专 业	重症医学			
研究方向	脓毒症			
答 辩 委 员 会	姓 名	职 称	学科专业	工作单位
	姜利	主任医师,教授	重症医学	首都医科大学宣武医院
	郭建萍	研究员, 教授	内科学(风湿病)	北京大学人民医院
	李纾	副主任医师,副 教授	重症医学	北京大学人民医院

注：1. “*” 为学位论文评阅人；

2. 参加匿名评阅的学位申请人的答辩委员会委员组成，可有 2-7 人不是论文评阅人。