

• 论著 •

脓毒症小鼠中性粒细胞通过 CD80/CTLA-4 途径影响 T 淋巴细胞功能

孙燃 黄佳敏 刘璐 杨云稀 宋明明 邵一鸣 李林斌 孙炳伟

南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科, 江苏苏州 215002

通信作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨脓毒症小鼠中性粒细胞对 T 淋巴细胞(T 细胞)功能的影响以及 CD80/细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)途径在其中发挥的作用。**方法** ① 体内实验: 将 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为假手术组(Sham 组, $n=20$)、Sham+CTLA-4 抗体处理组(Sham+aCTLA-4 组, $n=20$)、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP 组, $n=30$)和 CLP+CTLA-4 抗体处理组(CLP+aCTLA-4 组, $n=30$)。采用 CLP 制备小鼠脓毒症模型; Sham 组不对盲肠进行结扎和穿孔, 余操作同 CLP 组; CTLA-4 抗体处理组分别于术后 6 h、24 h 腹腔注射 CTLA-4 抗体 50 μg 。术后 48 h, Sham 组、Sham+aCTLA-4 组随机取 6 只小鼠, CLP 组和 CLP+aCTLA-4 组随机取 14 只小鼠检测脾脏 T 细胞活化指标 CD69 的表达; 并取脾脏、骨髓和外周血, 应用流式细胞仪检测中性粒细胞表面 CD80 的表达; 采用免疫荧光法和流式细胞仪检测脾脏 T 细胞表面 CTLA-4 的表达。各组其余小鼠用于观察术后 96 h 生存情况。② 体外实验 1: 提取健康小鼠骨髓中性粒细胞, 分别用 LPS(1 mg/L)刺激 4、8、12 h, 每个时间点设置加入等量磷酸盐缓冲液(PBS)的对照组, 检测各时间点 CD80 的表达。③ 体外实验 2: 提取健康小鼠脾脏 T 细胞, 分为 PBS 对照组、LPS 组(LPS 终浓度 1 mg/L)、中性粒细胞组和中性粒细胞+LPS 组, 后两组建立中性粒细胞与 T 细胞共培养模型后再给予相应处理, 检测 T 细胞表面 CTLA-4 的表达; 以上述 4 组为对照, 再分别设置 CTLA-4 抗体处理组(CTLA-4 抗体终浓度 50 mg/L), 48 h 后采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中白细胞介素-2(IL-2)水平。**结果** ① 体内实验结果: 与 Sham 组比较, CLP 组脾脏、骨髓、外周血中性粒细胞表面 CD80 表达均上调, T 细胞表面 CTLA-4 表达明显增加[(9.98 $\pm$ 0.84)%比(3.48 $\pm$ 0.64)%, $P<0.05$], 说明脓毒症时中性粒细胞可能通过 CD80/CTLA-4 途径影响 T 细胞功能。与 CLP 组比较, CTLA-4 抗体可明显提高 CLP 小鼠 96 h 累积生存率(56.25%比 18.75%, $P<0.05$), 增加 T 细胞表面 CD69 的表达, 说明 CTLA-4 抗体可能会促进脓毒症时 T 细胞活化, 并提高生存率。② 体外实验结果: 随 LPS 刺激时间延长, 中性粒细胞表面 CD80 表达较 PBS 对照组明显增加, 并呈一定时间依赖性[4 h: (6.35 $\pm$ 0.40)%比(3.41 $\pm$ 0.40)%, 8 h: (8.57 $\pm$ 0.64)%比(3.09 $\pm$ 0.27)%, 12 h: (19.83 $\pm$ 1.06)%比(5.16 $\pm$ 0.36)%, 均 $P<0.05$]。与 PBS 对照组比较, 单纯 LPS 刺激对 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞表面 CTLA-4 的表达没有明显影响, 而与中性粒细胞共培养后 CTLA-4 的表达明显增加[CD4⁺: (4.92 $\pm$ 0.30)%比(3.33 $\pm$ 0.25)%, CD8⁺: (4.26 $\pm$ 0.21)%比(2.53 $\pm$ 0.66)%, 均 $P<0.05$]。与 LPS 刺激的中性粒细胞共培养后 CTLA-4 表达的增加趋势则更加明显[CD4⁺: (6.34 $\pm$ 0.50)%比(3.33 $\pm$ 0.25)%, CD8⁺: (6.21 $\pm$ 0.41)%比(2.53 $\pm$ 0.66)%, 均 $P<0.05$]。在 PBS 对照组和 LPS 组中, CTLA-4 抗体对 T 细胞分泌 IL-2 无明显影响。与 PBS 对照组比较, 与中性粒细胞共培养能抑制 T 细胞分泌 IL-2 (ng/L: 1 938.00 $\pm$ 68.45 比 2 547.00 $\pm$ 218.00, $P<0.05$), 与 LPS 刺激后中性粒细胞共培养则抑制作用更明显 (ng/L: 1 073.00 $\pm$ 34.39 比 2 547.00 $\pm$ 218.00, $P<0.05$); 而 CTLA-4 抗体的加入可部分恢复 IL-2 的分泌。说明中性粒细胞在促进 T 细胞表面 CTLA-4 表达后, 可能通过减少 IL-2 生成来介导 T 细胞功能抑制。**结论** 脓毒症时中性粒细胞可介导 T 细胞功能障碍, 而 CD80/CTLA-4 途径在其中发挥了重要作用。拮抗 CTLA-4 后, 脓毒症小鼠生存率和 T 细胞功能明显改善, 这可能会成为脓毒症免疫治疗的新方法。

【关键词】 脓毒症; 免疫抑制; 中性粒细胞; T 淋巴细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4**基金项目:** 国家自然科学基金(81772135, 82072217); 江苏省自然科学基金(BK20201178)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210113-00047

Neutrophils mediate T lymphocyte function in septic mice via the CD80/cytotoxic T lymphocyte antigen-4 signaling pathway

Sun Ran, Huang Jiamin, Liu Lu, Yang Yunxi, Song Mingming, Shao Yiming, Li Linbin, Sun Bingwei

Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, Jiangsu, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of neutrophils on T lymphocyte function in septic mice and the role of CD80/cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) signaling pathway in this modulated effects. **Methods** ① *In vivo* experiment: 6–8 weeks old male C57BL/6 mice were divided into sham operation group (Sham group, $n=20$), Sham+CTLA-4 antibody treatment group (Sham+aCTLA-4 group, $n=20$), cecal ligation and perforation (CLP) induced

sepsis model group (CLP group, $n = 30$) and CLP+CTLA-4 antibody treatment group (CLP+aCTLA-4 group, $n = 30$) according to the random number table. CLP was used to reproduce mouse sepsis model. The mice in the Sham group were treated identically but their cecums were neither punctured nor ligated. In CTLA-4 antibody treatment groups, 50 μg CTLA-4 antibody was injected intraperitoneally 6 hours and 24 hours after the operation. Forty-eight hours after operation, 6 mice in Sham group and Sham+aCTLA-4 group, 14 mice in CLP group and CLP+aCTLA-4 group were randomly selected to detect the expression of CD69 in spleen. At the same time, spleen, bone marrow and peripheral blood were collected, and the expression of CD80 on neutrophils was detected by flow cytometry. The expression of CTLA-4 on the surface of T lymphocytes in spleen was detected by immunofluorescence and flow cytometry. The remaining mice in each group were used to observe the 96-hour survival after operation. ② *In vitro* experiment 1: neutrophils were extracted from bone marrow of healthy mice and stimulated with LPS (1 mg/L) for 4, 8 and 12 hours respectively. The control group was added with the same amount of phosphate buffered saline (PBS) at each time point, and the expression of CD80 was detected at each time point. ③ *In vitro* experiment 2: splenic T lymphocytes of healthy mice were extracted and divided into PBS control group, LPS group (final concentration of LPS 1 mg/L), neutrophil group and neutrophil+LPS group. In the latter two groups, the co-culture model of neutrophils and T lymphocytes was established, and then the corresponding treatment was given to detect the expression of CTLA-4 on the surface of T lymphocytes. With the above four groups as controls, CTLA-4 antibody treatment groups (final concentration of CTLA-4 antibody 50 mg/L) were set up respectively. After 48 hours, the level of interleukin-2 (IL-2) in the cell supernatant was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** ① Results of *in vivo* experiment: compared with Sham group, the expression of CD80 on neutrophils in spleen, bone marrow and peripheral blood was significantly up-regulated, while the expression of CTLA-4 on the surface of T lymphocytes was significantly increased [$(9.98 \pm 0.84)\%$ vs. $(3.48 \pm 0.64)\%$, $P < 0.05$]. It suggested that neutrophils may affect T lymphocytes function through CD80/CTLA-4 pathway in sepsis. Compared with CLP group, CTLA-4 antibody could significantly improve the 96-hour cumulative survival rate of CLP mice (56.25% vs. 18.75%, $P < 0.05$), and increase the expression of CD69 on the surface of T lymphocytes. It suggested that CTLA-4 antibodies might increase T lymphocytes activation in sepsis and improve survival. ② Results of *in vitro* experiment: with the prolongation of LPS stimulation, the expression of CD80 on neutrophils gradually increased in time-dependent manner as compared with PBS control group [4 hours: $(6.35 \pm 0.40)\%$ vs. $(3.41 \pm 0.40)\%$, 8 hours: $(8.57 \pm 0.64)\%$ vs. $(3.09 \pm 0.27)\%$, 12 hours: $(19.83 \pm 1.06)\%$ vs. $(5.16 \pm 0.36)\%$, all $P < 0.05$]. Compared with PBS control group, the expression of CTLA-4 on CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes was not significantly affected by LPS stimulation alone, but CTLA-4 was increased after co-culture with neutrophils [CD4⁺: $(4.92 \pm 0.30)\%$ vs. $(3.33 \pm 0.25)\%$, CD8⁺: $(4.26 \pm 0.21)\%$ vs. $(2.53 \pm 0.66)\%$, both $P < 0.05$], and the increased trend of CTLA-4 was more obvious after co-culture with LPS-stimulated neutrophils [CD4⁺: $(6.34 \pm 0.50)\%$ vs. $(3.33 \pm 0.25)\%$, CD8⁺: $(6.21 \pm 0.41)\%$ vs. $(2.53 \pm 0.66)\%$, both $P < 0.05$]. In the PBS control group and LPS group, CTLA-4 antibody had no significant effect on IL-2 secretion of T lymphocytes. Compared with PBS control group, co-culture with neutrophils could inhibit the secretion of IL-2 by T lymphocytes (ng/L: 1 938.00 $\pm$ 68.45 vs. 2 547.00 $\pm$ 218.00, $P < 0.05$), and the inhibitory effect of neutrophils stimulated by LPS was more obvious (ng/L: 1 073.00 $\pm$ 34.39 vs. 2 547.00 $\pm$ 218.00, $P < 0.05$). CTLA-4 antibodies could partially restore IL-2 secretion. In conclusion, after promoting the expression of CTLA-4 on the surface of T lymphocytes, neutrophils might mediate the inhibition of T lymphocytes function by reducing the production of IL-2. **Conclusions** Neutrophils mediate T lymphocytes dysfunction in sepsis, and the CD80/CTLA-4 pathway plays an important role. The CTLA-4 antibody improves survival and T lymphocytes function in sepsis mice, which may be a new method of immunotherapy for sepsis.

【Key words】 Sepsis; Immunosuppression; Neutrophil; T lymphocyte; Cytotoxic T lymphocyte antigen-4

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81772135, 82072217); Jiangsu Provincial Natural Science Foundation of China (BK20201178)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210113-00047

脓毒症是重症监护病房(intensive care unit, ICU)最常见的死亡原因^[1]。脓毒症期间宿主免疫反应复杂,包括过度的炎症反应^[2]。然而,临床上使用抗炎治疗来控制这种过度炎症的破坏性影响时,又使机体进入漫长的免疫抑制阶段。在免疫抑制期的死亡通常是由于感染无法控制,具有机会致病性^[3]。这就促使研究者要重新审视脓毒症的病理生理机制。

免疫抑制越来越被认为是导致脓毒症发病和死亡的重要因素,针对免疫抑制的干预是治疗脓毒症的新途径^[4]。抑制性免疫调节因子会阻碍清除病原体所需的免疫反应。目前,包括程序性死亡受体-1

(programmed death-1, PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4)在内的免疫检查点受体已被证实在脓毒症患者免疫细胞中增加,并被认为是参与脓毒症患者免疫功能障碍^[5]。CTLA-4是T淋巴细胞(T细胞)活化和增殖早期重要的抑制因子之一,与CD28具有相同配体CD80/CD86,然而CTLA-4对这两种配体的亲和力较CD28更高(20~100倍),可以部分抵消CD28诱导的T细胞共刺激信号^[6]。有研究表明,脓毒症时多种免疫细胞表面CD80/CD86表达增加,但中性粒细胞CD80/CD86如何变化则鲜有报道。阻断PD-1、CTLA-4对肿瘤

预后的益处已经被验证^[7-8],但与 PD-1 相比,关于拮抗 CTLA-4 在脓毒症中作用的研究较少。本研究采用小鼠盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 模型及体外脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激中性粒细胞模拟脓毒症状态,同时建立中性粒细胞和 T 细胞共培养模型,并应用 CTLA-4 抗体进行干预,探讨脓毒症时中性粒细胞对 T 细胞功能的影响以及 CD80/CTLA-4 途径在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及伦理学:清洁级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体质量 20~25 g,购自江苏大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(苏)2018-0053。本实验中所有动物处置方法均符合动物伦理学标准,并已经通过了南京医科大学实验动物福利伦理委员会审批(审批号:2101007)。

1.2 体内实验

1.2.1 实验分组:将实验小鼠按随机数字表法分为 4 组,即假手术组 (Sham 组, $n=20$)、Sham+CTLA-4 抗体处理组 (Sham+aCTLA-4 组, $n=20$)、CLP 致脓毒症模型组 (CLP 组, $n=30$) 和 CLP+CTLA-4 抗体处理组 (CLP+aCTLA-4 组, $n=30$)。

1.2.2 模型制备及处理:采用 CLP 法制备小鼠脓毒症模型。麻醉小鼠后开腹,在距离盲肠末端 0.5 cm 处结扎并用针头贯穿盲肠,挤出少许肠内容物后将盲肠放回腹腔、关腹;Sham 组仅将盲肠取出后即刻放回腹腔并关腹。CTLA-4 抗体处理组分别于术后 6 h、24 h 腹腔注射 CTLA-4 抗体 50 μg 。各组小鼠均于术后腹腔注射 1 mL 生理盐水补液。术后 48 h,Sham 组、Sham+aCTLA-4 组随机取 6 只小鼠,CLP 组和 CLP+aCTLA-4 组随机取 14 只小鼠脾脏、骨髓和外周血,检测中性粒细胞表面 CD80 表达,同时检测脾脏 T 细胞表面 CTLA-4 表达;其余小鼠用于观察术后 96 h 生存情况。

1.3 体外实验

1.3.1 小鼠骨髓中性粒细胞提取:取 6 只健康小鼠,颈椎脱臼法处死后取胫骨、股骨,平衡盐溶液冲出骨髓,冲洗液离心弃上清液,重悬细胞后缓慢置于 Percoll 梯度溶液 (78%、69%、52%) 上,离心,收集位于 78% 与 69% 溶液之间的细胞,离心并裂解残余红细胞。培养基重悬中性粒细胞至 2×10^6 个/mL 备用。

1.3.2 中性粒细胞培养:将提取的中性粒细胞按每孔 100 μL 种植于 96 孔板,分为磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 对照组和 LPS 组,每组再按不

同时间点分为 4、8、12 h 3 个亚组。LPS 组加入 LPS 溶液 (终浓度 1 mg/L);PBS 对照组加入等量 PBS。各组细胞置于培养箱中,于不同时间点检测中性粒细胞表面 CD80 表达。

1.3.3 小鼠脾脏 T 细胞提取:取 4 只健康小鼠脾脏,研磨至组织匀浆,过滤后离心,裂红、计数,加入抗体冰上孵育 15 min;加入磁珠孵育 30 min;稀释细胞至 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 后转移至无菌流式管,置于磁力架;6~8 min 后取细胞上清液,重复以上过程 3 次以增加细胞数量。离心得到 T 细胞,培养基重悬待用。

1.3.4 中性粒细胞与 T 细胞共培养:将细胞分 4 组,即 PBS 对照组、LPS 组 (LPS 终浓度 1 mg/L)、中性粒细胞组和中性粒细胞+LPS 组;以上述 4 组为对照,再分别设置 CTLA-4 抗体处理组,CTLA-4 抗体终浓度为 50 mg/L。取 96 孔培养板,功能抗体 CD3e 包被过夜。稀释 T 细胞为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入 CD28 功能抗体。LPS 刺激后的中性粒细胞按照分组依次加入孔板 (中性粒细胞:淋巴细胞为 2:1),每孔约 5×10^5 个细胞,共培养 48 h 后收集上清液用于细胞因子检测,收集细胞用于 T 细胞表面 CTLA-4 表达检测。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 中性粒细胞表面 CD80 表达以及 T 细胞表面 CTLA-4、CD69 表达检测:淋巴细胞抗原 6G (lymphocyte antigen 6G, Ly-6G) 抗体标记中性粒细胞,CD3、CD4、CD8 标记 T 细胞。各组样本加入相应抗体,避光孵育后清洗,用流式细胞仪检测 CD80、CTLA-4 和 CD69 的表达。

1.4.2 免疫荧光法观察 T 细胞表面 CTLA-4 表达:取小鼠脾脏石蜡块切片,脱蜡、水化、抗原修复后,滴加一抗 (CD3 和 CTLA-4),4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;次日孵育荧光标记二抗;加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液、封片。荧光显微镜下观察 CTLA-4 表达 (呈绿色),CD3 用于识别 T 细胞呈红色,细胞核呈蓝色。

1.4.3 细胞上清液中白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 水平检测:抽取 100 μL 细胞上清液,采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 IL-2 水平。

1.5 统计学分析:应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验。采用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析,累积生存率分析采用 Log-Rank 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

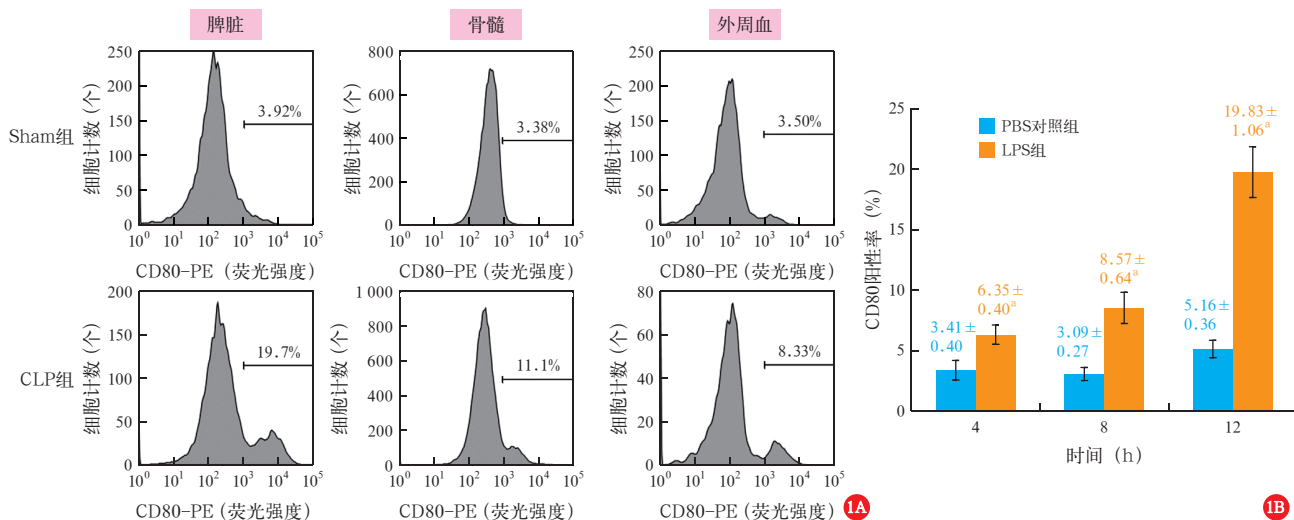
2.1 脓毒症时中性粒细胞表面 CD80 表达(图 1): 体内实验显示,与 Sham 组比较,CLP 术后 48 h 小鼠脾脏、骨髓和外周血中性粒细胞表面 CD80 表达均增加;体外实验也显示,与 PBS 对照组相比,LPS 组 CD80 表达随时间延长呈逐渐增加趋势(均 $P < 0.05$)。

2.2 脓毒症时 T 细胞表面 CTLA-4 表达(图 2): 体内实验免疫荧光显微镜下显示,脓毒症时小鼠脾脏有大量 CTLA-4 表达,其中在 T 细胞表面的表达明显增加;定量分析显示,CLP 组 CTLA-4 在脾脏 T 细胞表面的表达较 Sham 组明显增加($P < 0.05$)。

2.3 CTLA-4 抗体对 CLP 小鼠生存率及 T 细胞活化的影响(图 3~4): 体内实验显示,术后 96 h 内 Sham 组和 Sham+aCTLA-4 组均无小鼠死亡;与 Sham 组

相比,CLP 组小鼠累积生存率明显下降(18.75% 比 100.00%, $P < 0.05$);使用 CTLA-4 抗体后累积生存率较 CLP 组显著改善(56.25% 比 18.75%, $P < 0.05$)。同时,CLP 组小鼠脾脏 T 细胞活化指标 CD69 阳性率较 Sham 组明显增加;而注射 CTLA-4 抗体后,增加趋势更加明显。说明 CTLA-4 抗体能促进脓毒症时 T 细胞活化。

2.4 中性粒细胞对 T 细胞表面 CTLA-4 表达的影响(图 5): 体外共培养实验显示,与 PBS 对照组比较,单纯 LPS 刺激对 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞表面 CTLA-4 的表达均没有明显影响;而在与中性粒细胞共培养后,CTLA-4 表达较 PBS 对照组明显增加(均 $P < 0.05$);与 LPS 刺激的中性粒细胞共培养后,增加趋势更加明显(均 $P < 0.05$)。



注: A 为体内实验流式细胞仪检测结果, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, PE 为藻红蛋白。
B 为体外实验定量分析结果, PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖;与 PBS 对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 1 体内实验两组小鼠不同部位中性粒细胞与体外实验两组不同时间点小鼠骨髓中性粒细胞表面 CD80 的表达

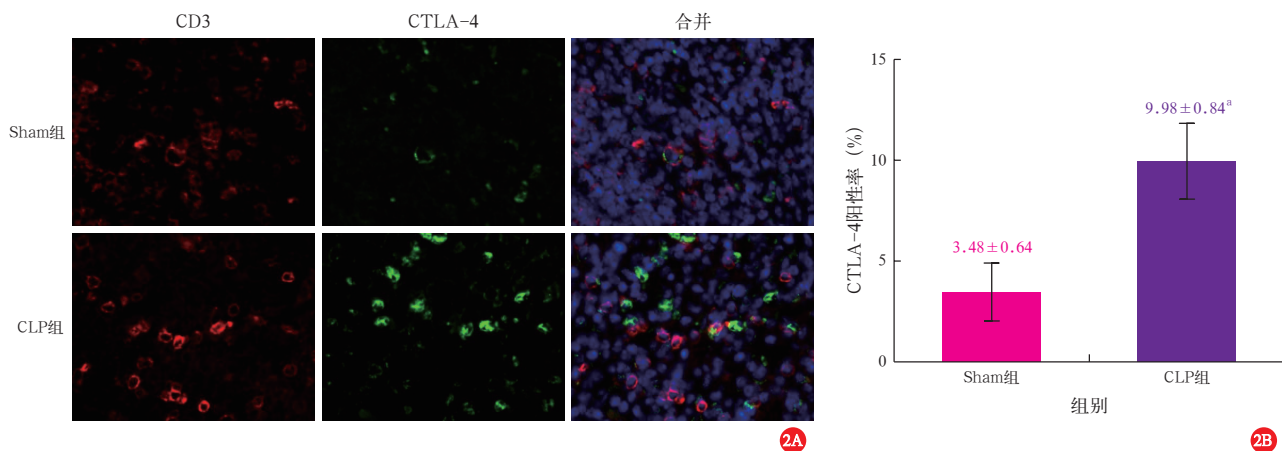
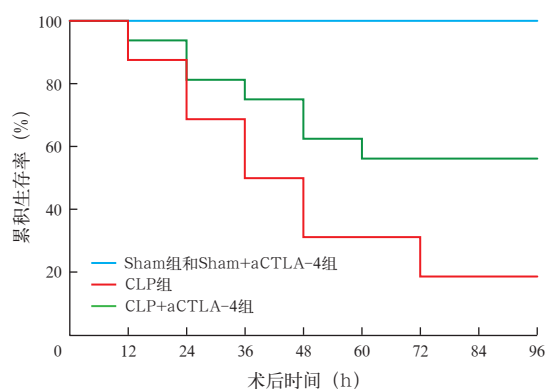
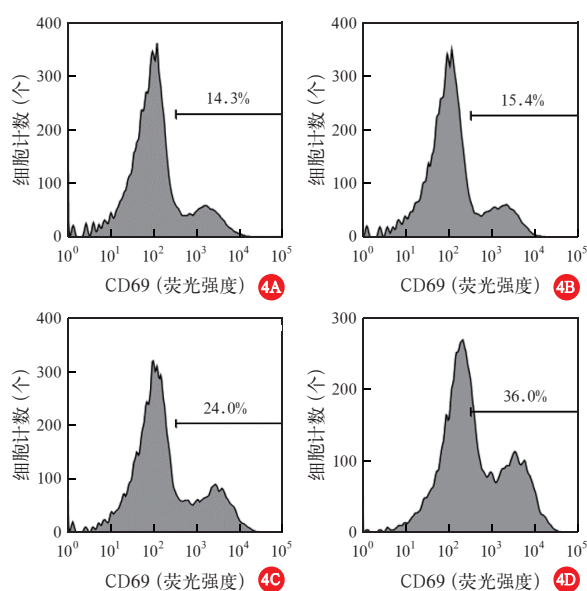


图 2 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞表面细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 表达 免疫荧光显微镜下显示 (A): CTLA-4 表达呈绿色, CD3 用于识别 T 淋巴细胞呈红色, 细胞核呈蓝色; 假手术组 (Sham 组) 小鼠脾脏仅有少量 CTLA-4 表达; 盲肠结扎穿孔术 (CLP) 致脓毒症模型组 (CLP 组) 有大量 CTLA-4 表达, 其中在 T 淋巴细胞表面的表达明显增加 免疫荧光染色 低倍放大。定量分析显示 (B): 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$



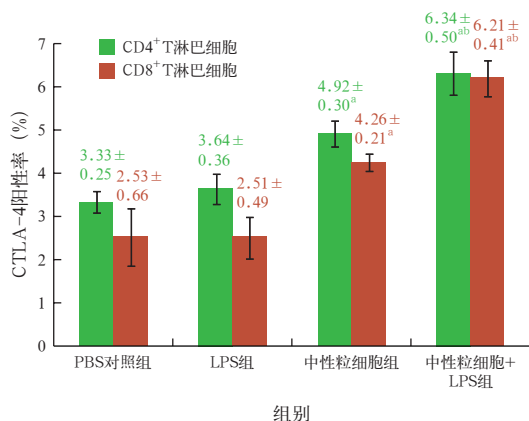
注: Sham 为假手术, aCTLA-4 为细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 抗体, CLP 为盲肠结扎穿孔术

图 3 各组小鼠术后 96 h Kaplan-Meier 生存曲线



注: A 为假手术 (Sham) 组, B 为 Sham+细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 抗体 (aCTLA-4) 组, C 为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 致脓毒症模型组 (CLP 组), D 为 CLP+aCTLA-4 组

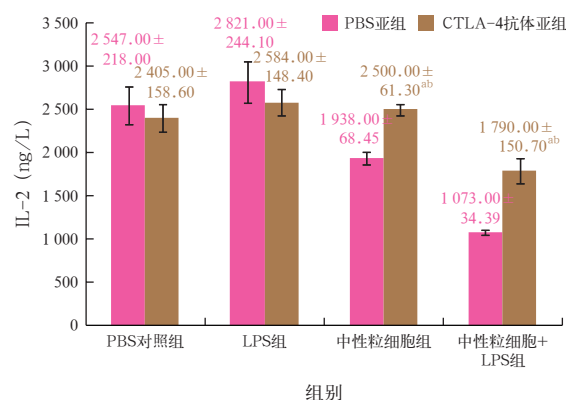
图 4 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞表面 CD69 表达



注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, CTLA-4 为细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4; 与 PBS 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与中性粒细胞组比较, ^b $P < 0.05$

图 5 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞表面 CTLA-4 表达比较

2.5 CTLA-4 抗体对 T 细胞分泌 IL-2 的影响(图 6): 体外实验显示,在 PBS 对照组和 LPS 组中, CTLA-4 抗体对 T 细胞分泌 IL-2 无明显影响。与中性粒细胞共培养能抑制 IL-2 分泌,与 LPS 刺激的中性粒细胞共培养后,该抑制作用更加明显;而 CTLA-4 抗体的加入可部分恢复 IL-2 分泌。由此说明,中性粒细胞在促进 T 细胞表面 CTLA-4 表达后,可能通过减少 IL-2 的生成来介导 T 细胞功能的抑制。



注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, CTLA-4 为细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4, IL-2 为白细胞介素-2; 与本组 PBS 亚组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 对照组 PBS 亚组比较, ^b $P < 0.05$

图 6 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞分泌 IL-2 水平比较

3 讨论

严重脓毒症患者免疫系统失调,免疫调节逐渐成为辅助治疗靶点^[9]。部分临床试验集中在抑制免疫系统,但这种方法未能明显改善脓毒症患者的结局^[10]。随着对脓毒症理解的加深,研究者逐渐意识到脓毒症相关死亡的主要原因是免疫系统被严重抑制^[11-12]。既往研究表明,脓毒症时中性粒细胞表面可表达免疫抑制性分子及抗原呈递相关分子,即对免疫功能具有双向调节作用^[13-14]。尽管正常情况下中性粒细胞只表达少量 CD80 或 CD86,但给予一定刺激或与 T 细胞共培养后,中性粒细胞表面 CD80 和 CD86 表达明显提高^[15]。

CTLA-4 与 CD28 竞争性结合 CD80/CD86,并向 T 细胞传递免疫抑制信号^[16]。与 CD86 相比, CD28 和 CTLA-4 则更倾向于与 CD80 结合^[17]。CTLA-4 融合蛋白能够激活 CTLA-4 的抑制途径,被用于预防移植排斥反应和治疗类风湿关节炎^[18]。相反,拮抗 CTLA-4 则可以改善肿瘤对机体免疫系统的抑制^[7]。既往动物实验结果显示,CLP 术后 CD4⁺、CD8⁺ 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)上的 CTLA-4 表达增加,体内抗 CTLA-4 治疗能够抑制脓毒症诱导的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞凋亡,但对促炎/抗炎细胞因

子几乎没有影响;同时,CTLA-4 抗体对生存率的影响存在剂量依赖性,高剂量使生存率下降,低剂量使生存率增加^[19]。另一项研究表明,抗 CTLA-4 治疗明显提高了脓毒症小鼠生存率(57.9% 比 27.8%),且增加了 γ -干扰素的分泌^[20]。

本研究表明,在脓毒症模型中,中性粒细胞表面 CD80 的表达明显增加,且 T 细胞表面 CTLA-4 的表达明显增加,同时体外与中性粒细胞共培养的 T 细胞被检测出更高的 CTLA-4 表达,这说明脓毒症时中性粒细胞可能通过 CD80/CTLA-4 途径影响 T 细胞功能。本研究通过体内注射 CTLA-4 抗体发现,拮抗 CTLA-4 表达可以提高 CLP 小鼠的生存率,同时提高 T 细胞活化指标 CD69 的表达。为了进一步证实脓毒症时中性粒细胞对淋巴细胞的影响,并验证 CD80/CTLA-4 途径在其中发挥的作用,本研究在体外进行两种细胞的共培养,发现中性粒细胞可以诱导 T 细胞表面 CTLA-4 表达并减少细胞因子 IL-2 的分泌,而 LPS 刺激后的中性粒细胞对 T 细胞的上述影响更加明显。另外,在共培养体系中加入 CTLA-4 抗体后发现,IL-2 的分泌得到了部分恢复。这意味着脓毒症状态下拮抗 CTLA-4 表达可以减轻中性粒细胞对 T 细胞的负向调控作用。

中性粒细胞不仅参与固有免疫,在适应性免疫中同样起着重要作用。它可以分泌大量细胞因子或者表达共刺激分子,通过与多种免疫细胞相互作用,调节适应性免疫中效应细胞的激活和增殖,从而在感染和肿瘤等一系列疾病的病理过程中发挥重要作用^[20-21]。本研究证实了脓毒症状态下中性粒细胞可以介导 T 细胞功能障碍的发生,而 CD80/CTLA-4 途径在其中发挥重要作用。拮抗 CTLA-4 表达后,脓毒症小鼠生存率和 T 细胞功能明显改善,可能是一种潜在的治疗脓毒症的新方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孙燃:研究设计、论文初稿撰写,黄佳敏、刘璐、杨云稀:实验操作、数据收集,宋明明、邵一鸣、李林斌:统计学分析、文献查阅,孙炳伟:实验指导、稿件审阅。所有作者都阅读并同意最终稿件

参考文献

- [1] 高经华,刘志锋.难治性脓毒性休克治疗的研究进展[J/CD].中华危重症医学杂志(电子版),2020,13(5):386-389. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2020.05.015.
- [2] 赵鹏跃,李宇轩,朱圣宇,等.脓毒症患者死亡危险因素研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2020,27(4):505-509. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.04.033.
- [3] Zhao PY, Li YX, Zhu SY, et al. Research advances in risk factors of death in sepsis patients [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2020, 27 (4):

- 505-509. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.04.033.
- [3] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13 (12): 862-874. DOI: 10.1038/nri3552.
- [4] 高经华,刘喆,刘志锋.共抑制分子在脓毒症免疫功能障碍中作用的研究进展[J].中华危重病急救医学,2020,32(1):121-125. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190916-00023.
- [5] Gao JH, Liu ZY, Liu ZF. Study progress of role of co-suppressor molecules in sepsis immune dysfunction [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (1): 121-125. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190916-00023.
- [5] Patil NK, Bohannon JK, Sherwood ER. Immunotherapy: a promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression [J]. Pharmacol Res, 2016, 111: 688-702. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.07.019.
- [6] Patil NK, Guo Y, Luan LM, et al. Targeting immune cell checkpoints during sepsis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (11): 2413. DOI: 10.3390/ijms18112413.
- [7] Ariyan CE, Brady MS, Siegelbaum RH, et al. Robust antitumor responses result from local chemotherapy and CTLA-4 blockade [J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6 (2): 189-200. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0356.
- [8] Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition [J]. Am J Clin Oncol, 2016, 39 (1): 98-106. DOI: 10.1097/COC.0000000000000239.
- [9] 董丽华,吕娟,丁黎莉,等.脓毒症免疫治疗的研究进展[J].中华危重病急救医学,2017,29(2):184-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.019.
- [10] Dong LH, Lyu J, Ding LL, et al. Advances in immunotherapeutic research of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (2): 184-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.019.
- [10] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm [J]. Immunotherapy, 2016, 8 (8): 959-970. DOI: 10.2217/imt-2016-0020.
- [11] Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, et al. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression [J]. Nat Med, 2009, 15 (5): 496-497. DOI: 10.1038/nm0509-496.
- [12] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13 (3): 260-268. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70001-X.
- [13] Huang X, Chen YP, Chung CS, et al. Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis [J]. J Immunol, 2014, 192 (3): 1091-1099. DOI: 10.4049/jimmunol.1302252.
- [14] Davey MS, Morgan MP, Liuzzi AR, et al. Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells [J]. J Immunol, 2014, 193 (7): 3704-3716. DOI: 10.4049/jimmunol.1401018.
- [15] Hänsch GM, Wagner C. Expression of MHC class II antigen and coreceptor molecules in polymorphonuclear neutrophils [J]. Chem Immunol Allergy, 2003, 83: 45-63. DOI: 10.1159/000071556.
- [16] 贾晓辉,王先火,张会来. CTLA-4 和 PD-1: 恶性淋巴瘤免疫治疗中潜在的作用靶点 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36 (10): 783-789. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2016.10.013.
- [17] Jia XH, Wang XH, Zhang HL. CTLA-4 and PD-1: the potential immunotherapeutic targets for malignant lymphoma [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2016, 36 (10): 783-789. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2016.10.013.
- [17] Sansom DM, Walker LS. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology [J]. Immunol Rev, 2006, 212: 131-148. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00419.x.
- [18] Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy [J]. J Clin Oncol, 2015, 33 (17): 1974-1982. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358.
- [19] Inoue S, Bo LL, Bian JJ, et al. Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis [J]. Shock, 2011, 36 (1): 38-44. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182168c6e.
- [20] Chang KC, Burnham CA, Compton SM, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis [J]. Crit Care, 2013, 17 (3): R85. DOI: 10.1186/cc12711.
- [21] Takashima A, Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell [J]. J Leukoc Biol, 2015, 98 (4): 489-496. DOI: 10.1189/jlb.1MR1014-502R.

(收稿日期: 2021-01-13)