

神经纤毛蛋白-1 与膜相关转化生长因子- β 共表达对调节性 T 细胞免疫抑制功能的影响

高玉雷¹, 姚咏明², 柴艳芬¹, 董宁²

(1. 天津医科大学总医院急诊医学科, 天津 300052 ;

2. 解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048)

【摘要】 目的 探讨神经纤毛蛋白-1 (Nrp-1) 与膜相关转化生长因子- β (TGF- β) 共表达对 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺ Treg) 免疫抑制功能的影响。**方法** 体外培养 Balb/c 小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞, 在抗 CD3/CD28 和脂多糖 (LPS) 诱导下, 给予不同浓度的抗 Nrp-1 抗体 (Ab-Nrp-1) 封闭 24 h 后收集细胞, 采用流式细胞分析仪检测细胞表面 Nrp-1 与膜相关 TGF- β 表达。分别将不同浓度 Ab-Nrp-1 封闭 1 h 后的 Treg 与小鼠正常 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞共培养, 观察抗 CD3/CD28 和 LPS 诱导下 12、24 和 48 h 后对 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖能力的影响。**结果** 在抗 CD3/CD28 和 LPS 诱导下, Treg 表面 Nrp-1 与膜相关 TGF- β 表达率明显增加 (均 $P < 0.05$), Treg 膜相关 TGF- β 表达随着 Ab-Nrp-1 浓度的增加逐渐降低, 呈明显的浓度依赖性 ($P < 0.05$); 正常 Treg 与 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞共培养后, 能显著抑制 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖功能 ($P < 0.05$), 而不同浓度 Ab-Nrp-1 处理能逆转抑制作用, 其中 5 $\mu\text{g/ml}$ 已达最大效应 ($P < 0.05$), 且 24 h 后作用最强, 具有明显的浓度-时间依赖性 ($P < 0.05$)。**结论** Treg 通过膜相关 TGF- β 发挥免疫抑制功能, 共表达 Nrp-1 能够明显增强其免疫抑制作用。

【关键词】 调节性 T 细胞; 神经纤毛蛋白-1; 膜相关转化生长因子- β ; 免疫抑制

Neuropilin-1 is a co-expression receptor for membrane associated transforming growth factor- β contributing to the immunosuppressive property of regulatory T cells GAO Yu-lei*, YAO Yong-ming, CHAI Yan-fen, Dong Ning. *Emergency Department of General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Corresponding author: YAO Yong-ming, Department of Microbiology and Immunology, Burns Institute, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China, Email: c_ff@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of co-expression of neuropilin-1 (Nrp-1) and transforming growth factor- β (TGF- β) on regulatory T cell (Treg)-mediated immunosuppression. **Methods** CD4⁺CD25⁺ Tregs were isolated from the spleens of male Balb/c mice. CD4⁺CD25⁺ Tregs were blocked with various doses of Nrp-1 antibody (Ab-Nrp-1, 0.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours with anti-CD3/CD28 and lipopolysaccharide (LPS) stimulation, and expression of Nrp-1 and TGF- β was determined by flow cytometry. Meanwhile, CD4⁺CD25⁺ Tregs were cultured with different doses of Ab-Nrp-1 for 1 hour, and co-cultured with CD4⁺CD25⁻ T cell for 12, 24 and 48 hours respectively, the proliferative activity of CD4⁺CD25⁻ T cells was analyzed by microplate reader. **Results** Compared to control group, the expressions of Nrp-1 and TGF- β were significantly increased under anti-CD3/CD28 and LPS stimulation (both $P < 0.05$), and treatment with Ab-Nrp-1 markedly inhibited the expression of TGF- β in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The normal Treg had the potential to inhibit the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells ($P < 0.05$), while various doses of Ab-Nrp-1 had the ability to reverse the immunosuppressive function of CD4⁺CD25⁺ Treg in a dose- and time-dependent response manner, 5 $\mu\text{g/ml}$ has the strongest ability, especially after 24 hours. **Conclusion** Treg cell plays an important role in mediating immunosuppressive response via membrane associated TGF- β , and co-expression of Nrp-1 can markedly promote the immunosuppressive function.

【Key words】 Regulatory T cell; Neuropilin-1; Membrane associated transforming growth factor- β ; Immunosuppression

已知 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺ Treg) 在维持外周免疫耐受、防止自身免疫性疾病发生以及控制慢性感染性疾病中发挥了重要作用, 然而, 过度的免疫负向调控能够削弱机体清除病原和抵抗肿瘤能力, 引起严重的免疫抑制^[1-3]。Treg 通

过 T 淋巴细胞毒性相关抗原-4 (CTLA-4)、膜相关转化生长因子- β (TGF- β) 及糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR) 介导的细胞接触机制和分泌白细胞介素-10 (IL-10)、TGF- β 及 IL-35 等抑制性细胞因子发挥免疫抑制效应; 另外也可通过影响细胞代谢和产生细胞毒性作用调节机体固有免疫和适应性免疫反应^[1-5]。神经纤毛蛋白-1 (Nrp-1) 不仅具有调节神经发育和血管生成的作用, 而且具有免疫调节效应。Nrp-1 高表达于 Treg, 在 Treg 发

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.04.006

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81130035, 81071545); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2012CB518102); 全军“十二五”计划重大项目 (AWS11J008)

通信作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com

育、存活以及发挥免疫负向调控中具有重要作用,且 Nrp-1 与叉头翼状螺旋转录因子 3 (Foxp3) 表达呈明显正相关^[6-9]。虽然 Treg 表面 Nrp-1 能够激活游离的 TGF- β , 增强 Treg 免疫抑制功能^[6], 但 Nrp-1 是否在 Treg 膜相关 TGF- β 介导的免疫负向调控中发挥协同作用尚不清楚。本研究通过体外培养小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞, 初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组及处理: 6~8 周龄雄性清洁级 Balb/c 小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 动物合格证号: SCXK 京 2009-0007。将小鼠适应性饲养 1 周, 自由进食水, 室温 25 $^{\circ}$ C, 昼夜节律为 12 h。分离提取脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg, 分为对照组、抗 CD3/CD28 组、脂多糖 (LPS) + 抗 CD3/CD28 组和抗 Nrp-1 抗体 (Ab-Nrp-1) 0.5、5、10 μ g/ml 组; 另将 3 种不同浓度 Ab-Nrp-1 封闭 1 h 的正常 CD4⁺CD25⁺Treg 在抗 CD3/CD28 和 LPS 诱导下与 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞共培养, 并设正常细胞对照组, 观察 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞增殖能力改变, 各组均设 6 个重复孔。

1.2 细胞分离及培养: 断颈处死小鼠后无菌取脾脏, 使用小鼠脾脏淋巴细胞分离液分离小鼠单个核细胞。按照磁珠分离原理分离小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞, 离心洗涤后, 加入生物素-抗体鸡尾酒、抗生物素磁珠和 CD25⁻藻红蛋白 (PE) 抗体, 阴选后获得 CD4⁺T 细胞; 离心洗涤后重悬细胞, 加入抗-PE 磁珠, 阳选后获得 CD4⁺CD25⁺Treg, 收集流出细胞为 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞^[1,3]。流式细胞仪检测两种细胞纯度分别约为 94% 和 92%, 锥虫蓝染色细胞存活率均超过 96%, 可以进行实验。将分离后的细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶/ml, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜, 恢复细胞活性。离心洗涤细胞, 调整细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶/ml, 各培养孔终体积为 200 μ l。抗 CD3/CD28 组培养孔使用 5 μ g/ml 抗 CD3 孵育 1 h, 种板后加入抗 CD28 终浓度为 2 μ g/ml。LPS+ 抗 CD3/CD28 组加入 LPS 终浓度为 100 ng/ml。CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞共培养细胞比例为 1:1, 共培养前 CD4⁺CD25⁺Treg 经 Ab-Nrp-1 预封闭 1 h, 并洗涤细胞, 共培养时间为 12、24 和 48 h。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 流式细胞分析仪检测 Treg 膜相关分子表达:

收集培养 24 h 后 Treg, 离心弃上清液, 加入 100 μ l 磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬细胞 (2 $\times$ 10⁵), 分别加入别藻蓝蛋白 (APC) 标记抗小鼠 Nrp-1 和 TGF- β 抗体各 10 μ l, 设阴性对照管; 4 $^{\circ}$ C 下避光孵育 30 min, 加入 PBS 2~3 ml 离心洗涤 2 次, 弃上清液; 加入 200 μ l PBS 重悬细胞, 流式细胞分析仪检测表达率。

1.3.2 多功能酶标仪检测 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞增殖能力: CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞共培养 12、24、48 h 后, 各孔吸出 100 μ l 上清液, 并加入 10 μ l 细胞毒性/增殖检测试剂-8 (CCK-8), 继续培养 1~2 h, 通过多功能酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

1.4 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 软件处理各组数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

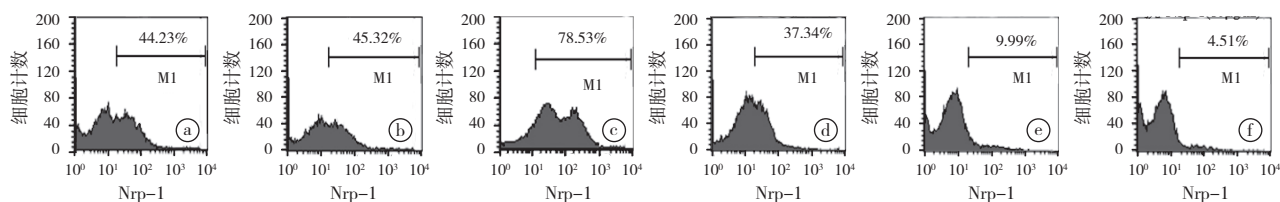
2.1 Ab-Nrp-1 对 CD4⁺CD25⁺Treg 表面 Nrp-1 和膜相关 TGF- β 表达的影响 (表 1; 图 1~2): 与对照组和抗 CD3/CD28 组比较, LPS 诱导能明显促进 CD4⁺CD25⁺Treg 表面 Nrp-1 和膜相关 TGF- β 的表达 (均 $P < 0.05$); 在抗 CD3/CD28 和 LPS 诱导下, 与 LPS+ 抗 CD3/CD28 组比较, 不同浓度 Ab-Nrp-1 均能明显封闭细胞表面 Nrp-1, 其中高浓度封闭效果最强 ($P < 0.05$)。膜相关 TGF- β 表达随抗体浓度增加其表达率逐渐降低 (均 $P < 0.05$), 呈明显的抗体浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

表 1 LPS 诱导 24 h 后 Ab-Nrp-1 对 CD4⁺CD25⁺Treg 表面 Nrp-1 与膜相关 TGF- β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Nrp-1 (%)	膜相关 TGF- β (%)
对照组	6	43.587 $\pm$ 0.479	26.553 $\pm$ 0.811
抗 CD3/CD28 组	6	44.567 $\pm$ 0.673	26.370 $\pm$ 0.783
LPS+ 抗 CD3/CD28 组	6	56.180 $\pm$ 0.815 ^{ab}	48.710 $\pm$ 2.499 ^{ab}
Ab-Nrp 0.5 μ g/ml 组	6	36.662 $\pm$ 0.759 ^{ac}	32.140 $\pm$ 0.988 ^{ac}
Ab-Nrp-1 5 μ g/ml 组	6	10.620 $\pm$ 0.471 ^{acd}	25.630 $\pm$ 0.892 ^c
Ab-Nrp-1 10 μ g/ml 组	6	5.045 $\pm$ 0.514 ^{ace}	20.718 $\pm$ 0.961 ^{ace}

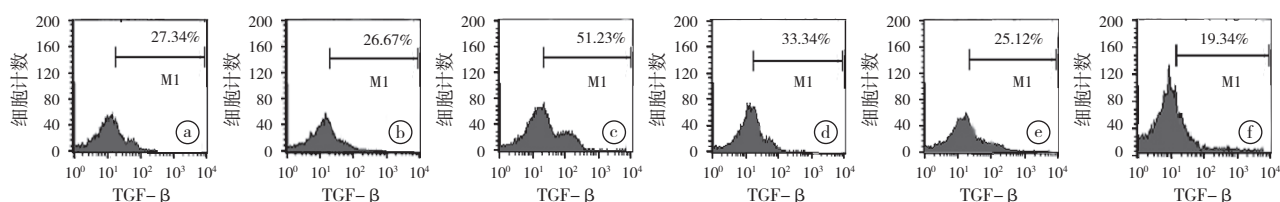
注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与抗 CD3/CD28 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+ 抗 CD3/CD28 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 Ab-Nrp 0.5 μ g/ml 组比较, ^d $P < 0.05$; 与 Ab-Nrp-1 5 μ g/ml 组比较, ^e $P < 0.05$

2.2 Ab-Nrp-1 对 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫抑制效应的影响 (表 2~3): 与 LPS 和抗 CD3/CD28 诱导下的 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞组比较, 未经 Ab-Nrp-1 封闭的 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞共培养 24 h 后, 能够抑制 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞的增殖



①:对照组; ②:抗 CD3/CD28 组; ③:LPS+ 抗 CD3/CD28 组; ④:Ab-Nrp-1 0.5 µg/ml 组; ⑤:Ab-Nrp-1 5 µg/ml 组; ⑥:Ab-Nrp-1 10 µg/ml 组

图 1 Ab-Nrp-1 干预 24 h 后 Treg 表面 Nrp-1 表达的流式分析图



①:对照组; ②:抗 CD3/CD28 组; ③:LPS+ 抗 CD3/CD28 组; ④:Ab-Nrp-1 0.5 µg/ml 组; ⑤:Ab-Nrp-1 5 µg/ml 组; ⑥:Ab-Nrp-1 10 µg/ml 组

图 2 Ab-Nrp-1 干预 24 h 后 Treg 膜相关 TGF-β 表达的流式分析图

($P < 0.05$), 但随 Ab-Nrp-1 封闭浓度的增加, 其抑制作用逐渐减弱, 具有明显的浓度依赖性 ($P < 0.05$), 其中 5 µg/ml 已经达到最大效应, 与 10 µg/ml 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与抗 CD3/CD28 组比较, LPS 诱导 12 h 能够促进 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖能力, 而 24 h 逐渐表现为抑制 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$); CD4⁺CD25⁺ Treg 和 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞共培养 24 h, 未经 Ab-Nrp-1 处理的 Treg 对 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖能力的抑制作用最强, 但随着抗体浓度的增加, 其抑制作用逐渐减弱, 具有明显的浓度依赖性 ($P < 0.05$), 其中 5 µg/ml 组作用最为明显。进一步分析发现, 5 µg/ml Ab-Nrp-1 干预 12 h 后, CD4⁺CD25⁺ Treg 对 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖的抑制作用开始减弱, 24 h 达最大效能, 具有明显的时间依赖性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

CD4⁺CD25⁺ Treg 以高表达 IL-2α (CD25) 及特征性标志 Foxp3 为主要特征, 具有免疫无反应性和免疫抑制性。根据来源不同, Treg 主要分为胸腺中发育的自然性 Treg (nTreg) 和抗原诱导外周 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞转化而来的诱导性 Treg (iTreg), 后者包括 Treg1/ 辅助性 T 细胞 3 (Treg1/Th3), 狭义上 Treg 指 nTreg^[1-5,9-10]。尽

表 2 不同浓度 Ab-Nrp-1 封闭 Treg 与 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞共培养 24 h 对 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	样本数	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞增殖能力 (A 值)
CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞	LPS+ 抗 CD3/CD28 组	6	0.640 ± 0.026
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 和 CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞	Ab-Nrp-1 0 µg/ml 组	6	0.510 ± 0.022 ^a
	Ab-Nrp-1 0.5 µg/ml 组	6	0.595 ± 0.037 ^{ab}
	Ab-Nrp-1 5 µg/ml 组	6	0.614 ± 0.023 ^{bc}
	Ab-Nrp-1 10 µg/ml 组	6	0.626 ± 0.017 ^b

注: 与 LPS+ 抗 CD3/CD28 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Ab-Nrp-1 0 µg/ml 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 Ab-Nrp-1 0.5 µg/ml 组比较, ^c $P < 0.05$

表 3 5 µg/ml Ab-Nrp-1 封闭 Treg 1 h 后与 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞共培养 12、24 和 48 h 对 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	样本数	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞增殖能力 (A 值)		
			12 h	24 h	48 h
CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞	对照组	6	0.215 ± 0.021	0.448 ± 0.040	0.365 ± 0.021
	抗 CD3/CD28 组	6	0.386 ± 0.021 ^a	0.748 ± 0.052 ^a	0.869 ± 0.120 ^a
	LPS+ 抗 CD3/CD28 组	6	0.500 ± 0.007 ^{ab}	0.640 ± 0.026 ^{ab}	0.630 ± 0.029 ^{ab}
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 和 CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 淋巴细胞	Ab-Nrp-1 0 µg/ml 组	6	0.408 ± 0.024 ^{ac}	0.510 ± 0.022 ^{abc}	0.520 ± 0.029 ^{abc}
	Ab-Nrp-1 5 µg/ml 组	6	0.499 ± 0.014 ^{abd}	0.614 ± 0.023 ^{abde}	0.615 ± 0.035 ^{abde}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与抗 CD3/CD28 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+ 抗 CD3/CD28 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 Ab-Nrp-1 0 µg/ml 组比较, ^d $P < 0.05$; 与共培养 12 h Ab-Nrp-1 5 µg/ml 组比较, ^e $P < 0.05$

管 CD4⁺CD25⁺ Treg 在 CD4⁺ T 淋巴细胞中比例为 5% ~ 10%, 但其在严重感染及恶性肿瘤诱导的免疫抑制中扮演着关键性角色^[1-5,11]。机体遭受严重感染后, 过度激活的 Treg 通过分泌 TGF-β 和高表达膜相关 TGF-β, 引起的 CD4⁺CD25⁻ T 淋巴细胞免疫

无反应性、功能性分化和过度凋亡是诱发细胞免疫功能低下的重要机制之一^[4,6,12]。因此,降低 Treg 分泌 TGF- β 和下调膜相关 TGF- β 表达对临床治疗有潜在价值。

近年来研究发现, Nr β -1 高表达于 Treg, 而 Treg1/Th3 和 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞则低表达或不表达^[6-9]。小鼠 Nr β -1 能够协同性激活 Treg 分泌的游离态无活性潜伏肽 (LAP)-TGF- β , CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Nr β -1 T 淋巴细胞结合 Nr β -1-Fc 后能够增强其结合 TGF- β 的能力^[6]。然而,目前尚缺乏有关 Treg 表面 Nr β -1 是否协同促进膜相关 TGF- β 表达的研究报道。Glinka 等^[13]通过对小鼠黑色素瘤或乳腺癌研究发现,高表达 Nr β -1 的小鼠肿瘤细胞,其细胞膜相关 TGF- β 亦明显上调;而 Nr β -1 敲除明显抑制肿瘤的生长,初步提示 Nr β -1 与细胞膜相关 TGF- β 具有协同效应^[12,14]。因此,我们设想 Nr β -1 能够促进膜相关 TGF- β 介导的 Treg 免疫抑制功能,阻断 Nr β -1 能够削弱 Treg 对 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖活性的抑制作用。本实验中选择抗 CD3/CD28 作为 Treg 初始活化诱导剂, LPS 模拟感染环境,探讨不同浓度 Ab-Nr β -1 对 Treg 膜相关 TGF- β 表达的影响。基于既往体外试验发现,小鼠 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 在 LPS 诱导 24 h 后其活性及对 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞免疫抑制能力明显增强,两种细胞比例为 1:1 时抑制能力最为显著^[1-3]。本组资料进一步探讨了 Ab-Nr β -1 对 Treg 抑制 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖能力的影响。

本研究显示, LPS 诱导 24 h 后 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 表面 Nr β -1 和膜相关 TGF- β 表达率明显升高;给予 Ab-Nr β -1 干预后,膜相关 TGF- β 表达率随着 Ab-Nr β -1 浓度的增加逐渐降低,其中高浓度作用最强。在探讨 Ab-Nr β -1 对 Treg 抑制 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖能力的影响中发现,中浓度的 Ab-Nr β -1 已经达到最大效应,因此我们选择 5 μ g/ml 抗体作为最佳干预浓度。结果证实,5 μ g/ml Nr β -1 抗体处理 12 h 后, Treg 对 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖的抑制作用开始减弱,24 h 后 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖能力已达到正常对照水平,呈明显时间依赖性。这与 Nakamura 等^[4]发现小鼠 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 在抗 CD3/CD28 诱导下高表达膜相关 TGF- β , 阻断膜相关 TGF- β 能够明显削弱 Treg 抑制 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 淋巴细胞增殖的结果相符。提示膜相关 TGF- β 介导的细胞接触机制,在 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 免疫负向调控过程中发挥关键作用。本实验表明, Nr β -1 能够

通过促进膜相关 TGF- β 表达,发挥协同效应。

本组资料进一步证明了膜相关 TGF- β 介导的细胞接触机制是 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 发挥免疫抑制功能的重要途径之一;共表达 Nr β -1 能够促进膜相关 TGF- β 的表达,阻断 Nr β -1 则通过降低膜相关 TGF- β 表达,进而削弱 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 所致免疫抑制状态。通过 Nr β -1 靶向抗肿瘤治疗已取得了理想的效果,例如,基于血管内皮生长因子的羟基末端最后 6 个氨基酸能够特异性结合 Nr β -1 的原理设计的二环多肽 EG3287,可有效地抑制人脐静脉内皮细胞增殖以及人肺癌细胞 A549 和肾癌细胞的迁移^[15]。鉴于此,深入探讨 Nr β -1 在 Treg 中的作用机制及其干预途径,将为严重感染等免疫功能紊乱性疾病的防治提供新思路。

参考文献

- [1] Zhang Y, Yao YM, Huang LF, et al. The potential effect and mechanism of high-mobility group box 1 protein on regulatory T cell-mediated immunosuppression. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31 (2): 249-257.
- [2] Liu QY, Yao YM, Yu Y, et al. Astragalus polysaccharides attenuate postburn sepsis via inhibiting negative immunoregulation of CD4 $^{+}$ CD25 high T cells. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e19811.
- [3] Zhu XM, Yao YM, Liang HP, et al. High mobility group box-1 protein regulate immunosuppression of regulatory T cells through toll-like receptor 4. *Cytokine*, 2011, 54 (3): 296-304.
- [4] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med*, 2001, 194 (5): 629-644.
- [5] 张莹, 姚咏明. 调节性 T 细胞与脓毒症关系的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2006, 18 (11): 695-697.
- [6] Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol*, 2008, 84 (1): 302-310.
- [7] Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3 $^{+}$ T reg cells. *J Exp Med*, 2012, 209 (10): 1723-1742.
- [8] Yadav M, Louvet C, Davini D, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*, 2012, 209 (10): 1713-1722.
- [9] Papatriantafyllou M. T cells: neuropilin 1 - distinguishing TReg cell subsets. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12 (11): 746.
- [10] 戴新贵, 姚咏明, 艾宇航. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对辅助性 T 细胞漂移的影响及血必净注射液的干预作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21 (3): 135-138.
- [11] 姚咏明. 免疫功能紊乱在脓毒症发病中的作用及意义. *中国危重病急救医学*, 2007, 19 (3): 138-141.
- [12] Xu L, Kitani A, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol*, 2010, 3 (3): 230-238.
- [13] Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, et al. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis*, 2011, 32 (4): 613-621.
- [14] Hansen W, Hutzler M, Abel S, et al. Neuropilin 1 deficiency on

CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. J Exp Med, 2012, 209 (11): 2001–2016.

- [15] Jia H, Bagherzadeh A, Hartzoulakis B, et al. Characterization of a bicyclic peptide neuropeptide-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals

importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. J Biol Chem, 2006, 281 (19): 13493–13502.

(收稿日期: 2013-02-27) (本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

1 例重症劳力性热射病继发多种严重并发症患者的护理体会

林明霞

(海南省农垦总医院 ICU, 海南 海口 570311)

2012 年 5 月 24 日本科收治 1 例重症劳力性热射病患者, 经过积极抢救和精心护理, 最终治愈出院, 报告如下。

1 一般资料

患者男性, 32 岁, 因剧烈运动后出现高热、四肢抽搐、昏迷 1.5 h 入院, 体温 41 ℃、脉搏 150 次/min、呼吸频率 26 次/min、血压 (BP) 101/57 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa), 入院完善相关检查后立即给予物理降温、药物降温、亚低温治疗、镇静、控制抽搐、大量补液扩容、血管活性药物维持血压、器官支持、气管插管、保持内环境稳定、营养支持等治疗, 并给予多巴胺持续静脉泵入。第 2 日患者体温下降、无抽搐, 复查肝酶明显升高、胆红素升高, 血小板计数 (PLT) 下降、出凝血功能障碍, 考虑急性肝功能衰竭 (肝衰)、弥散性血管内凝血 (DIC)、多器官功能障碍综合征 (MODS), 对症处理后, 第 5 日患者较前好转, 意识障碍改善, 仅低热, 动态监测肝酶逐渐下降, 胆红素持续上升, 意识模糊, 呼唤可应答, 复查氧合尚好, 拔除气管导管, 但拔管后胃管引出血性物质, 考虑急性消化道出血, 给予禁食、抑酶等治疗。第 7 日患者意识转清, 动态监测 PLT 升高、出凝血功能改善, DIC 已基本纠正。第 10 日输注洗涤红细胞悬液, 动态监测血红蛋白及红细胞计数 (RBC) 升高, 考虑消化道出血已停止; 胆红素持续升高, 患者无肝性脑病表现。第 11 日肝功能示丙氨酸转氨酶 (ALT) 368 U/L, 天冬氨酸转氨酶 (AST) 112 U/L, 总胆红素 (TBil) 300.5 μmol/L, 直接胆红素 (DBil) 187.9 μmol/L, 间接胆红素 (IBil) 112.6 μmol/L。并于当日始连续 4 d 给予血浆吸附 + 血液透析治疗, 肝酶及胆红素下降, 复查肝功能: ALT 243 U/L, AST 110 U/L, TBil 69.6 μmol/L, DBil 38.2 μmol/L, IBil 31.4 μmol/L。经过 25 d 救治, 患者意识转清, 无抽搐躁动, 无发热, 生命体征、病情、血流动力学稳定, 无电解质和酸碱平衡紊乱, 氧合好, DIC 及休克已纠正, 消化道出血已停止, 肝功能逐渐恢复, 复查炎症及感染指标不高, 多次血培养未见细菌生长, 转至普通科室继续治疗, 25 d 后治愈出院。

2 护理体会

2.1 降温:病房室温 22 ℃, 给予背部和头部亚低温治疗, 氯丙嗪 50 mg、异丙嗪 50 mg 经冰盐水快速静脉滴注降温以降低脑代谢和脑细胞耗氧量, 维持体温在 32~34 ℃^[1]; 每小时进行皮肤按摩, 保持皮肤清洁, 预防压疮发生。

2.2 氧疗:氧疗可扩张缺血细胞的血管, 使血流速度加快, 改善微循环^[2]。患者入科后立即行经鼻气管插管, 给氧, 监

测动脉血气变化, 6 d 后拔除气管导管, 改行鼻导管吸氧。

2.3 人工气道护理:该患者行经鼻气管插管, 应及时、定时吸痰, 保持气道通畅, 防止气道黏膜压伤、坏死, 预防肺部感染和意外拔管发生, 做好口腔护理。

2.4 并发症的护理:对抗癫痫、抗休克治疗的患者要密切观察生命体征变化; 对 DIC 患者应根据凝血指标检查结果, 调整肝素剂量^[2]。对急性肝衰患者在内科综合治疗基础上加用血浆置换串联连续性静-静脉血液滤过 (CVVH) 是有效的治疗手段之一^[3]。对消化道出血的患者, 应给予胃肠减压, 观察胃液的量和颜色、有无血便, 出血停止后可经胃管泵入肠内营养 (EN) 及鼻饲流质。

感染是发生 MODS 的常见病因, 在全身性炎症反应“瀑布”效应中, 主要诱因是细菌/内毒素, “毒热证”、“瘀血证”和“急性虚证”贯穿于 MODS 的始终, 因此活血化瘀、清热解毒、扶正固本、通腑攻下为基本治法^[4]。除及时合理使用强效抗菌药物外, 早期联合连续性肾脏替代治疗 (CRRT), 可有效清除炎症介质。对置入气管导管、中心静脉导管、血液透析管、尿管、胃管等多种管道者, 应注意做好管道护理, 为控制各种导管相关性感染积极采取预防、护理措施。

热射病患者机体处于高代谢状态, 早期建立 EN 以防止肠道细菌及内毒素移位、有效减少 MODS 发生^[5]。由于该患者有急性消化道出血, 仅靠 EN 难以在早期达到所需的营养目标, 因此 EN 联合肠外营养 (PN) 是早期营养支持的最佳途径^[6], 用营养泵经胃管给予 EN 混悬液, 开始泵入量 20 ml/h, 4 h 检查胃残余量 1 次, 若胃残余量 < 200 ml 且无腹胀、腹泻, 每 8 h 增加喂养量 20 ml/h, 至目标量; 若胃内残余量 > 200 ml, 或有腹胀、腹泻, 则暂停给药, 4 h 后再评估, 每日注意监测体温、进行动态营养评价。

参考文献

- [1] 田永明, 廖燕. ICU 护理手册. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] 于丽娜. 体能训练致劳力性热射病的护理对策. 西南国防医药, 2008, 18 (6): 905–906.
- [3] 杨永峰, 黄平, 张宁, 等. 血浆置换并联合或串联血液滤过治疗肝衰竭疗效比较. 中国危重病急救医学, 2009, 21 (2): 111–113.
- [4] 李志军. 菌毒炎并治与多器官功能障碍综合征. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (6): 381–383.
- [5] 徐杰. 危重病患者肠黏膜屏障的变化与肠内营养. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (6): 385–387.
- [6] 路勇, 贾文钊, 王征. 慢性阻塞性肺疾病急性加重机械通气患者早期肠内肠外联合营养与肠内营养支持治疗的临床疗效比较. 中国危重病急救医学, 2012, 24 (7): 436–438.

(收稿日期: 2012-10-18)

(本文编辑: 李银平)