

· 论 著 ·

调节性 T 细胞对严重烧伤大鼠肠道 T 细胞免疫和内毒素移位的影响*

陈鑫¹, 万珍倩², 邓鸿教¹, 曾志刚¹, 张红艳^{1△}

(1. 南昌大学第一附属医院烧伤科, 南昌 330006; 2. 江西省丰城矿务局丰矿总医院, 江西宜春 331141)

摘要:目的 观察调节性 T 细胞(Treg)在严重烧伤大鼠肠道淋巴结中的表达变化,探讨其变化对肠道淋巴结其他 T 淋巴细胞的影响及其与肠道内毒素移位的关系。方法 取雄性 SD 大鼠 50 只,分成正常对照组和烧伤后 0.5、1、2、4 h 组(各 10 只),对各烫伤组大鼠背部造成 30% 全身表面积 III 度烧伤;分离肠道淋巴结,采用流式细胞仪技术检测肠道淋巴结 Treg、CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 淋巴细胞的表达变化;采用浊度法(动态浊度法)检测门静脉血浆内毒素水平。结果 烧伤后大鼠肠道 Treg 表达与 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 淋巴细胞比值呈负相关($r = -0.827, P < 0.01$);而 Treg 水平与门静脉血浆 ET 水平呈正相关($r = 0.782, P < 0.01$)。结论 严重烧伤大鼠肠道淋巴结 Treg 表达的增加,对肠道其他 T 淋巴细胞有免疫抑制作用,与肠道内毒素移位有着密切的关系。Treg 在严重烧伤后肠道免疫屏障中可能起重要的作用。

关键词:调节性 T 细胞;肠道免疫;烧伤;肠源性感染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)01-0016-02

Effect of Treg on intestinal T-cell immunity and endotoxin translocation in rats after severe burns*

Chen Xin¹, Wan Zhenqian², Deng Hongao¹, Zeng Zhigang¹, Zhang Hongyan^{1△}

(1. Department of Burn, The first affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi Fengcheng Mining Bureau Feng Mining General Hospital, Yichun 331141, China)

Abstract: Objective To observe the change of regulatory T cells expression in severely burned rats gut, To investigate the effects of regulatory T cells on CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ lymphocytes and its relation with gut-origin endotoxin translocation. **Methods** Fifty SD male rats were randomly divided into normal control group ($n=10$) and burn model groups ($n=40$). Rats were burned to achieve III degree scalding, and a 30% total body surface area (TBSA) burn model was made. Rats were sacrificed before (normal control group) and after 0.5, 1, 2, 4 burn hour (PBH groups). Flow cytometry techniques were used for the detection of the expressions of regulatory T cells and CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ lymphocyte in intestinal lymph nodes which were separated. The dynamic turbidity method was used for detection of endotoxin levels in portal vein blood. **Results** The expression of regulatory T cells was negatively correlated with CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ lymphocyte ratio ($r = -0.827, P < 0.01$) in intestinal lymph node of rats, while the regulatory T cells was positively correlated with ET levels in portal vein blood plasma, ($r = 0.782, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of the regulatory T cells in intestinal lymph node in severely burned rats was increased compared to that in normal control group. Regulatory T cells suppressed the expression of intestinal T lymphocytes, leading to gut immune inhibition. The translocation of intestinal endotoxin has a close relationship with regulatory T cells in severely burned rats. Regulatory T cells could have portal effects on intestinal immunity barrier.

Key words: Regulatory T cells; intestinal immunity; burns; endotoxin bacterial translocation

脓毒血症和多器官功能障碍综合征(MODS)是严重烧伤、创伤、休克和感染的主要死亡原因。严重烧伤后肠道免疫功能抑制可导致肠道内毒素(ET)移位,进而诱发脓毒血症和 MODS^[1]。而烧伤后肠黏膜淋巴细胞功能抑制是肠道免疫功能抑制的重要因素^[2],目前烧伤后肠黏膜淋巴细胞功能确切的细胞和分子机制尚不清楚。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是存在于免疫系统内的一类对细胞免疫具有独特抑制作用的 T 细胞亚群,在移植耐受、肿瘤免疫、感染性疾病及许多自身免疫性疾病中起到抑制细胞免疫作用^[3-4]。Huang 等^[5]发现严重烧伤患者外周血 Treg 数量明显增高,而 Treg 与烧伤后肠道 T 细胞功能抑制及内毒素移位相关性,目前尚未见报道。为此,作者建立大鼠严重烧伤模型,检测烧伤大鼠肠道淋巴结 Treg、CD4⁺/CD8⁺ 及外周血和门静脉 ET 水平,以探讨烧伤后肠黏膜免疫抑制机制。

1 材料与方

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体质量 150~200 g,购自南昌大学

医学院动物科技部。

1.2 试剂与仪器 小鼠抗大鼠 CD25⁺-FITC、小鼠抗大鼠 CD4⁺-PE 和 foxp3⁺-PE、破膜剂均购自美国公司,大鼠淋巴细胞分离液、鲎试剂盒购自湛江海洋生物制品厂,控时控压控温蒸汽烫伤实验仪由南昌大学烧伤研究所提供,流式细胞仪购自美国 BD 公司产品。

1.3 实验动物分组及标本制备

1.3.1 动物分组 50 只 SD 大鼠,分成正常对照组(10 只)和严重烧伤组(40 只),根据观察时相点的不同,严重烧伤组再分为伤后 0.5、1、2、4 h 组,各组动物数均为 10 只。

1.3.2 标本制备 大鼠购买后无菌饲养 1 周以上,实验前禁食过夜,自由饮水。清醒状态下背部脱毛,用控时控温控压蒸汽烫伤仪造成大鼠 30% 全身表面积 III 度烧伤,烫伤仪参数设置:压力 3 MPa、温度 107 ℃、时间 8 s;伤后立即腹腔注射乳

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960401)。作者简介:陈鑫(1987-),住院医师,硕士学位,主要研究方向为小儿烧伤的救治及烧伤后肠道免疫。△ 通讯作者, Tel:13507918158; E-mail:zhycn2008@163.com。

酸林格氏液(40 mL/kg)抗休克,各组大鼠在不同时相点严格无菌取外周血及门静脉血标本,然后严格无菌取全段肠管,游离出所有淋巴结,置预冷的含体积分数 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液中,用 100 目不锈钢细胞筛网轻碾磨,400 目尼龙网过滤,滤液用 300 g 离心力离心 10 min 后重悬于培养液中,加细胞悬液于大鼠淋巴细胞分离液中以离心半径 8 cm,2 000 r/min 离心 20 min;细胞重悬于适量培养液中即获得 PP 结淋巴细胞悬液。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 门静脉血血浆 ET 含量的测定 采用改良过氯酸法预处理血浆,鲎试剂(动态浊度法)定量检测。

1.4.2 肠道 PP 结 Treg、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的检测 应用流式细胞仪测定淋巴细胞悬液中 Treg 亚群的百分比。取不同荧光标记的单克隆抗体加入 1 mL 淋巴细胞悬液中分别标记,用流式细胞仪检测 10 000 个细胞 CELLQuest 程序系统软件分析数据,记录阳性细胞百分率,去除非异性对照值。其中 CD4FITC/CD25PE/foxP3PE-Cy5 都标记上的细胞定为 Treg 阳性细胞,阳性细胞与 CD4 FITC 标记细胞的比率为阳性细胞百分比;CD3PE 阳性细胞中计算 CD4FITC/CD8PE-Cy5 阳性细胞的比值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用方差分析和 *q* 检验,若组间方差不齐,采用非秩和检验。各指标间的相关性采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 门静脉血血浆 ET、肠道 PP 结 Treg、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的表达变化 烧伤后 0.5、1、2 h 及 4 h 肠道 PP 结 Treg 所占比例与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值在各时相点与正常对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),门静脉血血浆 ET 的变化与 Treg 相似,见表 1。

2.2 Treg 与 ET 及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值的相关性 相关分析表明肠道 PP 结 Treg 与门静脉血血浆 ET 呈正相关($r = -0.827, P < 0.01$),与 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值呈负相关($r = 0.782, P < 0.01$)。

表 1 Treg、CD4⁺/CD8⁺ 及门静脉 ET 的动态变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Treg(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	ET(Eu/mL)
正常对照组	10	8.07±0.82	1.61±0.13	0.32±0.24
伤后 0.5 h	10	17.42±1.17*	1.18±0.05*	2.21±0.15*
伤后 1 h	10	25.65±1.43*	0.85±0.04*	5.36±0.15*
伤后 2 h	10	36.83±0.68*	0.52±0.03*	8.04±0.13*
伤后 4 h	10	40.66±0.93*	0.36±0.03*	10.89±0.14*

*: $P < 0.01$,与正常组比较。

3 讨论

Treg 是由胸腺 T 细胞发育而来的,是具有调节功能的成熟的 T 细胞亚群,它占人体 CD4⁺T 细胞的 2%~3%,而在大鼠中占 5%~10%。Treg 抑制效应增强可使机体倾向 Th2 型反应,而 Treg 抑制能力减弱则会导致机体倾向于 Th1 型反应^[6-7],因此,Treg 活性某种程度上决定着炎症反应的转归。有研究认为烧伤后免疫力低下时 T 细胞由 Th1 型转向 Th2 型,以致产生大量抑制活性的细胞因子。

本实验研究表明,Treg 在严重烧伤后大鼠肠道淋巴结中的表达明显升高,同时伴有 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值降低。引起 Treg 表达变化的分子调控机制目前仍不明确,其可能机制是

当机体受到严重创伤时,富含组织相容性抗原的细胞膜等成分可释放至循环或组织中,这些变性或重新组合的自身抗原可诱导 Treg 的生成,同时机体分泌产生增加的 IL-2、TGF- β 等可溶性因子和膜结合因子对 Treg 的发育、存活及功能的维持也起到重要的作用;有研究表明活化的巨噬细胞可通过分泌 IL-10 来直接影响 Th0 细胞向 Treg 的极化,在高水平 IL-10 的作用下,抗原反复刺激可诱导 Th0 细胞向 Treg 分化^[8-9],在促进 Th0 细胞向 Treg 分化的过程中起着极为重要的作用^[10],作者分析认为严重烧伤后伴随巨噬细胞活性升高对 Treg 增殖及活性也可能有一定的影响。

本实验相关分析显示,CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值与 Treg 呈负相关,提示肠道淋巴结调节性 T 细胞对其他 T 淋巴细胞起抑制作用,Ni 等^[11]报道大鼠烫伤 7 d 内淋巴结调节性 T 细胞的活性明显升高,而且调节性 T 细胞活性的升高是通过 TGF- β 介导的细胞接触机制来实现的,同时 Th1 型免疫反应受到明显抑制,而下调 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达后 Th1 型反应则恢复正常。作者认为烧伤后肠黏膜淋巴细胞 Treg 比例升高,致使 CD4⁺/CD8⁺ 的比值发生改变,使机体倾向 Th2 型反应,从而导致肠道免疫功能抑制。

本实验结果显示,烧伤后门静脉血 ET 显著升高,与 Treg 的表达变化规律是基本一致的,提示严重烧伤后 Treg 水平升高,可能通过抑制其他淋巴细胞的活性,从而抑制肠道免疫功能,降低肠道的免疫屏障作用,导致肠道 ET 吸收增加,最终可使肠道 ET/细菌趁机通过肠道侵入机体,播散到肝脏、肠系膜淋巴结、脾脏、肾脏及血液中,致使肠源性感染的发生。

综上所述,严重烧伤后肠道淋巴结 Treg 表达的增加引起 CD4⁺/CD8⁺ 的比值的改变,可能导致肠道免疫功能的下降,出现肠道 ET 吸收的增加。因此,Treg 对严重烧伤后肠道的免疫屏障的调节有着重要的影响,可作为烧伤后肠道免疫功能紊乱调控的一个新靶点,但具体的调节机制目前尚不十分明确,有待进一步的实验去探索证明。

参考文献:

- [1] 杨宗城. 烧伤治疗学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2006:119-140.
- [2] Wu XW, Wang H, Wan QX, et al. Effects of intestinal trefoil factor combined with mucin on immune function of burn serum treated intestinal epithelial cells[J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2011, 27(5): 341-346.
- [3] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity[J]. Int J Cancer, 2010, 127(4): 759-767.
- [4] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cell sexpressing IL-2 receptor {alpha}-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 3808-3821.
- [5] Huang LF, Yao YM, Dong N, et al. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study [J]. Crit Care, 2010, 14(1): R3.
- [6] 陈鑫, 张红艳. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在严重烧伤等应激状态下对免疫系统的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(16): 1647-1649.
- [7] Niedbala W, Besnard AG, Jiang HR, et al. (下转第 20 页)

疗效果^[8-10]。依据细胞代谢障碍类型的不同,动物模型可以分为 Crigler-Najjar I、酪氨酸血症 I 型模型 (FAH 小鼠模型)、Wilson's 疾病 amon 大鼠模型、进展性家族性肝内胆胆汁淤积 III 型、mdr2 小鼠甲酰酶 (ornithine transcarbamylase, OTC) 缺陷模型、spf-ash 胆固醇血症模型 (Watanabe 可遗传的高脂血症家兔模型) 和 lmatian 狗模型。除此之外,也有许多其他途径可以制备出小鼠急性肝坏死模型,包括醋酐、二甲基亚硝胺、D-半乳糖、感染和外科肝次全切除术制备的急性肝衰竭模型;目前还采 CCl₄ 在大鼠建立起代偿失调性肝硬化模型^[11-14]。

CCl₄ 是诱导动物肝损伤模型的最常用的化学物质^[15],它在肝滑面内质网代谢,分解成为 ·CCl₃ 和 Cl, 具有自由基的 ·CCl₃ 可通过共用电子对和 P450 磷脂部分发生反应,继而与膜脂质和蛋白质大分子进行共价结合,使蛋白质代谢障碍,引起膜结构和功能完整性的破坏。另外,·CCl₃ 可抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵的活性,使内流增加。两种途径最终导致肝细胞浆中可溶性溶酶体酶渗出入血,引起一系列生化指标改变。

作者选用了两种不同剂量的 CCl₄ 分别腹腔注射诱导出不同程度的肝损伤,实验中采用的两种剂量的 CCl₄ 均能够引起典型的肝细胞损伤,且大剂量诱导的病变程度比较重。给予 50% CCl₄ 后 12~24 h,血清 ALT 活性即显著升高,24~72 h 后中央静脉周围出现广泛坏死;7d 后,肝组织即仍有部分坏死。应用 20%~50% CCl₄ 在 2 mL/kg 剂量下腹腔注射可诱导出不同程度的较为稳定的肝损伤,并且其浓度的高低决定肝损伤的程度。由于 CCl₄ 所致的肝衰竭模型损伤较重、模型肝功能受损持续时间长,有利于观察移植细胞情况。因此 20%~50% CCl₄ 所致急性肝损伤是肝细胞移植治疗实验较为理想的模型。

参考文献:

- [1] Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation; new possibilities for therapy[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(2): 568-571.
- [2] Wege H, Le HT, Chui MS. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(2): 432-444.
- [3] O'Grady J. Acute liver failure[J]. *Postgrad Med J*. 2005, 81(953): 148-154.
- [4] Newsome PN, Plevis JN, Nelsone LJ, et al. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation[J]. *Liver Transpl*, 2000, 6(1): 21-31.
- [5] Rahman TM, Hodgson HJ. Animal model of acute hepatic failure[J]. *Int J Exp Pathol*, 2000, 81(2): 145-157.
- [6] Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models[J]. *Metab Brain Dis*, 2005, 20(4): 409-423.
- [7] van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, et al. Large animal model of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(9): 1613-1625.
- [8] Akhter J, Johnson LA, Gunasegaram A, et al. Hepatocyte transplantation: a review of laboratory techniques and clinical experiences[J]. *Surgeon*, 2007, 5(3): 155-64.
- [9] Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases-future seems bright after all[J]. *Pediatric Transplantation*, 2008, 12(1): 4-5.
- [10] Cho CH, Parashurama N, Park EY, et al. Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells; applications for the treatment of liver failure[J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 898-909.
- [11] Patzer JF, Mazoriegos GV, Lopez R. Preclinical evaluation of the Excorp Medical Inc, Bioartificial Liver Support System[J]. *Jam Coll Surg*, 2002, 195(3): 299-310.
- [12] Ishizawa Y, Totsuka E, Umehara M, et al. Efficacy of double-filtration plasmapheretic cross-circulation with a high-permeability membrane using canine harvested liver in porcine fulminant hepatic failure model[J]. *Transpl Proceed*, 2004, 36(8): 2344-2348.
- [13] San-Miguel B, Alvarez M, Culebras JM, et al. N-acetylcysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(11): 1945-1957.
- [14] Nardo B, Tsivian M, Neri F, et al. Extracorporeal portal vein oxygenation improves outcome of acute liver failure in swine[J]. *Transpl Proceed*, 2008, 40(6): 2046-2048.
- [15] Yasuda M, Okabe T, Itoh J, et al. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation; application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and dimethylnitrosamine (DMN) [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(10): 1331-1339.

(收稿日期: 2013-08-13 修回日期: 2013-09-22)

(上接第 17 页)

- [1] Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function[J]. *J Immunol*, 2013, 191(1): 164-170.
- [2] Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells[J]. *Int Immunol*, 2004, 16(2): 249-256.
- [3] Brenu EW, Staines DR, Tajouri L, et al. Heat shock proteins and regulatory T cells[J]. *Autoimmune Dis*, 2013

(2013), 813256.

- [4] Mendoza L, Pardo F. A robust model to describe the differentiation of T-helper cells[J]. *Theory Biosci*, 2010, 129(4): 283-293.
- [5] Ni CN, MacConmara M, Zang Y, et al. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury[J]. *J Immunol*, 2006, 176(1): 225-36.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-22)