

# 脂多糖腹腔重复注射诱导脓毒症小鼠髓系抑制细胞的生成

王蓓蓓 贾蓓 曾辉

**【摘要】 目的** 探讨脂多糖(LPS)诱导脓毒症小鼠免疫抑制的细胞学机制。**方法** 腹腔高剂量LPS重复注射建立脓毒症小鼠模型;通过模型小鼠生存率和血浆细胞因子水平鉴定脓毒症的分期;区分粒系和单核系来源的髓系抑制细胞(MDSCs)亚群,流式细胞术检测其在感染性休克不同阶段的动态变化;通过CD4<sup>+</sup>T细胞增殖抑制实验评价其免疫抑制功能。**结果** 本研究利用腹腔重复注射高剂量LPS成功建立不同分期脓毒症小鼠模型;与正常对照小鼠相比,脓毒症小鼠骨髓、外周血和脾脏中的MDSCs细胞比例显著增加;不同MDSCs亚群均对CD4<sup>+</sup>T细胞具有明显增殖抑制作用。**结论** MDSCs在脓毒症免疫调节中发挥了重要作用,是介导脓毒症免疫麻痹的重要负向调节细胞。

**【关键词】** 内毒素;脓毒症;髓系抑制细胞;免疫抑制;T细胞

**Generation of myeloid-derived suppressor cells induced by repeated lipopolysaccharides intraperitoneal injection in mice with sepsis** WANG Bei-bei, JIA Bei, ZENG Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the cellular immunosuppressive mechanisms of sepsis induced by lipopolysaccharides (LPS) repeated injection. **Methods** The sepsis mice model was established by LPS intraperitoneal injection repeatedly. The stages of sepsis were evaluated according to the mortality and the plasma Th1/Th2 cytokine concentrations by CBA detection. The proportional dynamics of MDSC subsets at different septic stages were detected by flow cytometry. The immunosuppressive potential of MDSCs was assessed by inhibition of CD4<sup>+</sup>T cell proliferation. **Results** The mice model of sepsis with different immunologic stages was established successfully by high-dose of LPS injection. Compared to naïve mice, the frequency of MDSCs in bone marrow, blood and spleen significantly increased in septic mice with effectively immunosuppressive function. **Conclusion** MDSCs play an important role on sepsis-induced immunosuppression by down-regulating the adaptive immune responses.

**【Key words】** Lipopolysaccharides; Sepsis; Myeloid-derived suppressor cells; Immunosuppression; T cells

严重的免疫抑制是导致脓症患者死亡的重要因素之一<sup>[1-2]</sup>。新近研究发现,来源于骨髓的髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)具有免疫抑制功能,可介导肿瘤免疫逃逸<sup>[3-7]</sup>。2007年,Delano等<sup>[8]</sup>将MDSCs研究由肿瘤学扩展到感染免疫学领域,指出MDSCs对感染所致免疫抑制具有重要作用。MDSCs包括两种不同分化方向的细胞(粒细胞源性和单核细胞源性)<sup>[9-10]</sup>,由于缺乏

分离方法,导致基础及临床应用研究均停滞在混合细胞水平。本课题组前期创建了从Gfi1:GFP基因敲入小鼠骨髓中有效分离不同来源髓系细胞的方法;通过分析发现多种与免疫功能相关基因在这两类细胞中表达明显不同。由此推测,不同分化方向的MDSCs可能在脓毒症的不同阶段发挥不同的免疫功能。在脓毒症不同阶段针对不同分化方向的MDSC采取治疗,是防止机体免疫抑制的关键。

## 材料与方法

### 一、实验动物

本研究采用C57 BL/6背景杂合型Gfi1:GFP基因

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.20136.03.004

基金项目:国家自然科学基金(No. 81200316; No. 81071587)

作者单位: 100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所;新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

敲入小鼠(Gfi1GFP/+), SPF级, 鼠龄8~12周, 体重18~22 g。该转基因小鼠由加拿大蒙特利尔大学Tarik Moroy教授实验室引进, 于中国医学科学院动物研究所SPF级动物室繁育, 采用PCR法鉴定小鼠基因型。

## 二、主要试剂和材料

LPS购自美国Sigma公司; 抗小鼠CD11b-Percp/cy5.5抗体、抗小鼠Gr1-PE抗体、小鼠细胞因子检测CBA试剂盒均购自美国BD Pharmingen公司; 抗小鼠CD45-APC抗体、抗小鼠CD4-APC抗体、抗小鼠CD3e抗体、抗小鼠CD28抗体、7-AAD均购自美国eBioscience公司; 小鼠CD4 T细胞分选磁珠购自德国美天旎公司; CFSE购自美国Life Technologies™公司。

## 三、实验方法

1. 感染性休克模型的建立: 本研究采用高剂量LPS重复刺激模型。模型组小鼠每日于腹腔内注射高剂量LPS ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 连续7 d; 对照组于腹腔内注射相同体积PBS。LPS注射1周内密切观察模型小鼠的一般状态, 记录小鼠体温、呼吸等生命体征; 绘制生存曲线, 并分别在LPS注射前、注射后1 d、4 d和7 d处死小鼠进行相应检测。

2. 流式液相多重蛋白定量技术(cytometric bead array, CBA): 通过检测物与捕获微球共孵育, 标记荧光探测试剂(FITC或PE标记), 进而通过流式细胞仪检测细胞因子。本研究分离模型小鼠和正常小鼠血浆分别检测其细胞因子水平。

3. 流式细胞检测: 分离模型小鼠和正常对照小鼠骨髓、外周血和脾脏, 行抗小鼠CD45-APC、CD11b-Percp/cy5.5、抗-Gr1-PE直标法染色, 应用流式细胞仪(FACS Calibur, 美国BD公司)获取细胞, Flowjo 7.6软件(美国TreeStar公司)处理数据, 分析粒细胞MDSC-G ( $\text{CD11b}^+ \text{Gr1}^{\text{high}} \text{GFP}^+$ )和单核细胞MDSC-M ( $\text{CD11b}^+ \text{Gr1}^{\text{low}} \text{GFP}^-$ )在骨髓、外周血和脾脏中的比例及其在不同感染阶段的动态变化。

4.  $\text{CD4}^+$  T淋巴细胞增殖抑制实验: 利用免疫磁珠法分选正常小鼠脾脏 $\text{CD4}^+$  T淋巴细胞,  $1 \mu\text{mol/L}$  CFSE染色,  $5 \mu\text{g/ml}$  抗-CD3e和 $2 \mu\text{g/ml}$  抗-CD28刺激; 流式分选仪分离纯化LPS注射7 d的模型小鼠骨髓MDSC-G和MDSC-M, 将 $\text{CD4}^+$  T细胞与MDSC-G和MDSC-M按照不同比例(MDSCs/T比例分别为1:4、1:2、1:1、2:1)混合培养, 60 h后经抗-CD4-APC和7-AAD染料染色后, 通过流式细胞仪FACS Calibur获取细胞, 观察7-AAD $^- \text{CD4}^+$ 细胞中CFSE的衰减程度, 计算

$\text{CD4}^+$  T细胞增殖指数: 增殖指数(proliferation index, PI) = 与MDSCs共培养的 $\text{CD4}^+$  T细胞增殖百分率/未与MDSCs共培养的 $\text{CD4}^+$  T细胞增殖百分率 $\times 100\%$ , 以此评价MDSCs细胞亚群的抑制能力。

## 四、统计学处理

应用SPSS 13.0软件进行统计分析, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本t检验进行两组间比较, 采用Kaplan-Meier方法统计生存曲线差异, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

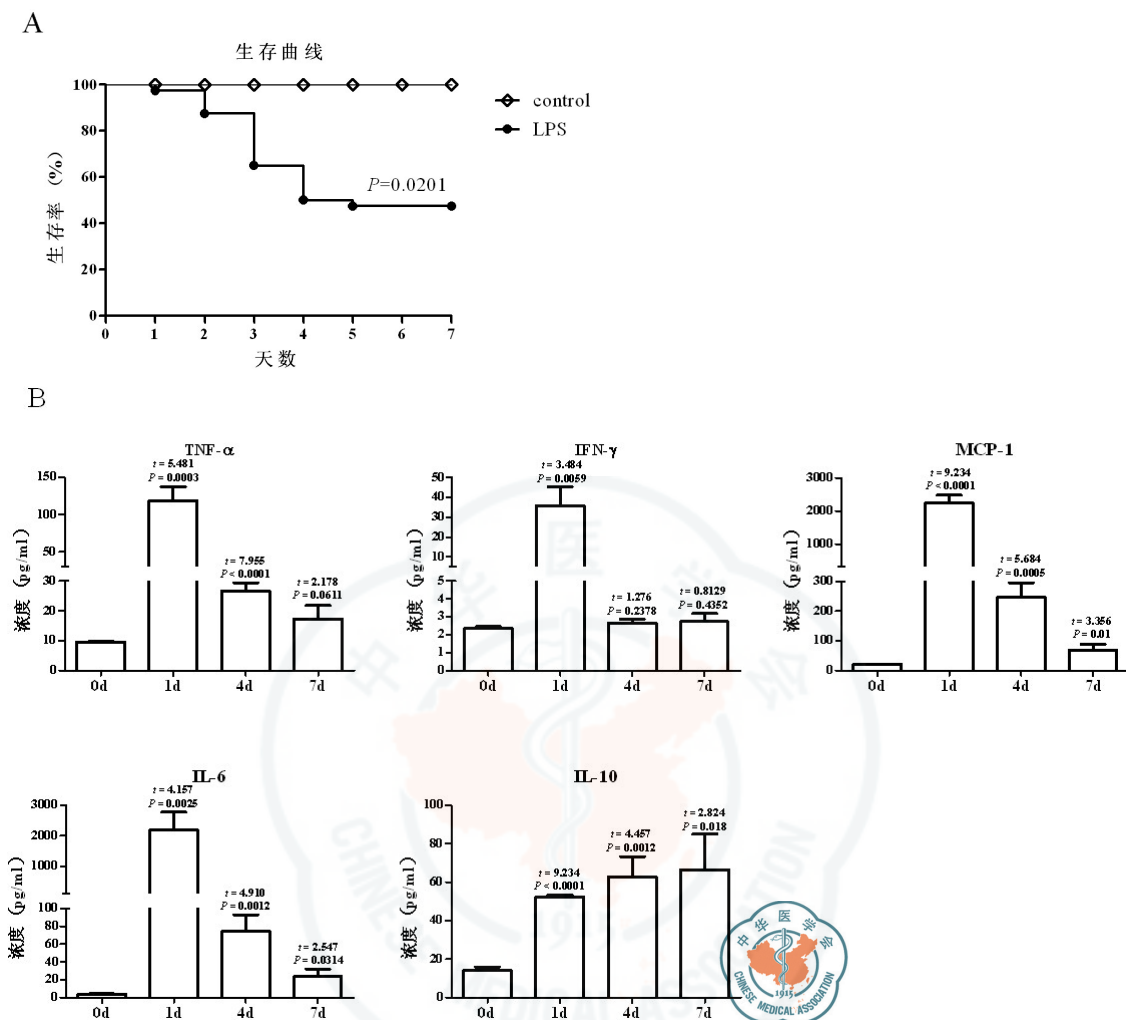
### 一、脓毒症小鼠模型的建立

本研究采用Gfi1:GFP基因敲入小鼠, 应用高剂量LPS重复注射方式, 成功复制了脓毒症小鼠模型。LPS注射12 h内, 动物出现病态: 嗜睡, 竖毛; 进食饮水减少; 或有腹泻, 脓尿, 眼角有分泌物。随病程进展上述症状加重, 并有皮肤淤点、淤斑; 濒死前出现寒颤、四肢僵硬; 呼吸困难, 甚至颈项强直。脓毒症小鼠经LPS注射后3~4 d为死亡高峰期, 至第7天病死率约为50%。PBS注射组小鼠7 d内无死亡(图1A)。

利用流式细胞因子CBA技术, 检测不同时间点(造模前0 d、造模后1 d、4 d、7 d)模型小鼠血浆Th1/Th2细胞因子浓度的动态变化。如图2A所示, LPS注射后1 d, 血浆Th1型细胞因子TNF- $\alpha$  [ $(118.07 \pm 9.70) \text{ pg/ml}$  vs  $(9.57 \pm 0.15) \text{ pg/ml}$ ]、IFN- $\gamma$  [ $(35.70 \pm 4.69) \text{ pg/ml}$  vs  $(2.35 \pm 0.05) \text{ pg/ml}$ ]、MCP-1 [ $(2242.18 \pm 117.78) \text{ pg/ml}$  vs  $(22.09 \pm 0.23) \text{ pg/ml}$ ], Th2型细胞因子IL-10 [ $(52.02 \pm 0.97) \text{ pg/ml}$  vs  $(14.05 \pm 0.95) \text{ pg/ml}$ ]和IL-6 [ $(2192.41 \pm 326.06) \text{ pg/ml}$  vs  $(3.79 \pm 0.24) \text{ pg/ml}$ ]水平与造模前相比均显著升高, 差异具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.01$ )。造模第4天, 血浆Th1型细胞因子水平显著下降, 至造模7 d时, Th1型细胞因子浓度接近造模前水平。与此同时, Th2型细胞因子IL-10随着脓毒症的进展呈持续增加趋势(图1B)。本研究即基于该免疫抑制期模型小鼠进行MDSCs的功能和机制研究。

### 二、不同分化方向的MDSCs亚群在脓毒症发展不同阶段的动态变化

由于缺乏特异性表面标记物, 小鼠MDSC一直被笼统地以 $\text{CD11b}^+ \text{Gr1}^+$ 这一混杂的细胞群体来研究。本研究在前期基础上, 利用Gfi1:GFP基因敲入小鼠, 根据Gfi1在粒细胞源性和单核细胞源性



注: A: LPS (10 mg/kg) 腹腔重复注射7 d, 模型小鼠生存曲线; 与PBS腹腔注射对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P=0.0201$ ); B: LPS注射后不同阶段, 脓毒症模型小鼠血浆细胞因子水平的动态变化。与造模前血浆细胞因子水平相比, 比较不同时间点血浆细胞因子浓度差异

图1 脓毒症小鼠模型的建立

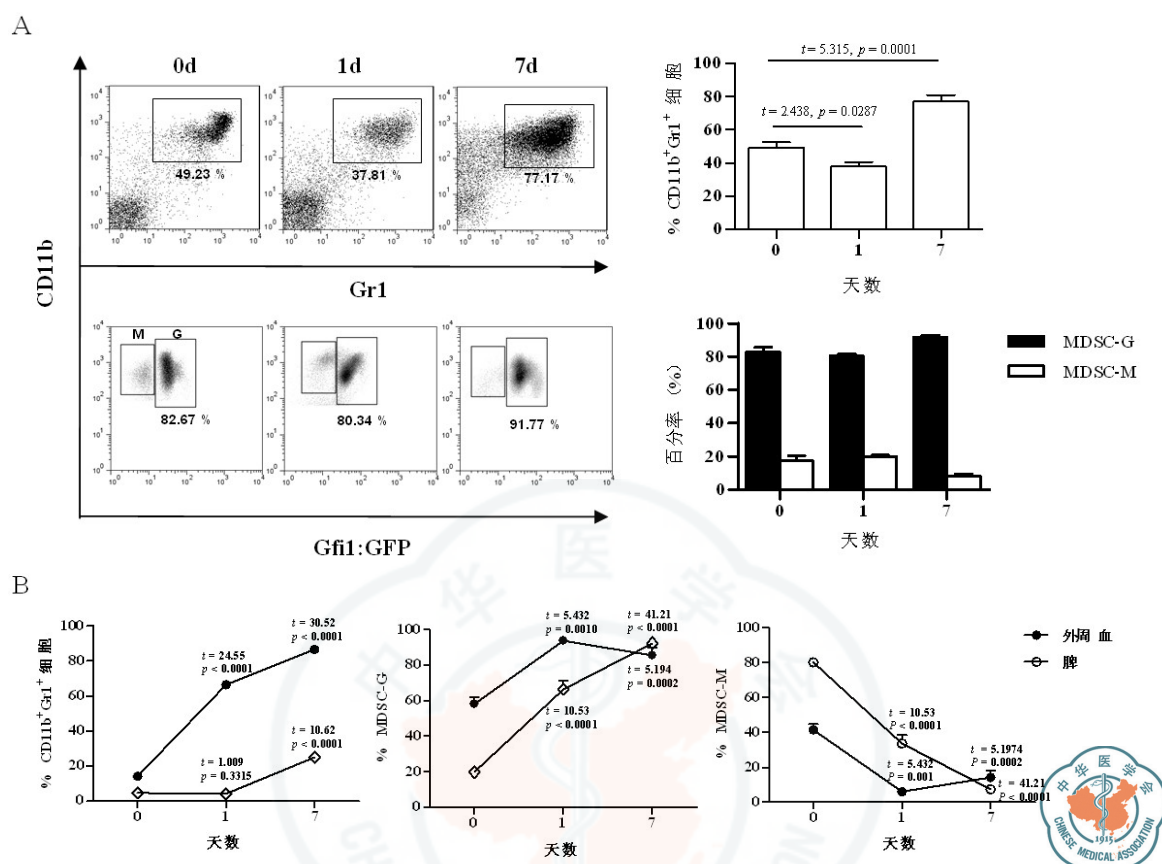
MDSCs中的差异表达, 成功地在小鼠骨髓、外周血和脾脏区分了CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>的MDSC-G和CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>的MDSC-M。为研究脓毒症不同阶段中, MDSCs在不同组织器官中数量及其亚群构成的动态变化, 本研究获取LPS造模后不同时间点的骨髓、外周血和脾脏细胞, 进行CD11b和Gr1染色。如图2A所示, 与正常对照组 ( $49.23\% \pm 1.13\%$ ) 相比, 骨髓CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>总MDSCs细胞比例在LPS注射1 d ( $37.81\% \pm 1.35\%$ ) 时发生短暂小幅下降, 随后即显著增加, 至注射7 d时, 其百分比可达 ( $77.17 \pm 2.07$ ) %。与此同时, 外周血和脾脏CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>MDSCs细胞比例则持续上升, 于造模后7 d达到高峰。而这些大量增殖的CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>细胞中, 大部分为GFP<sup>+</sup>的MDSC-G。如图2A、B所示, 伴随感染进展, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>的MDSC-G所占比例在骨髓、外周血和脾脏逐渐升高, 至造模

后7 d, 骨髓、脾脏、外周血中MDSC-G的比例占髓系细胞80%以上, 而CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>的MDSC-M的比例则持续下降 (图2B)。

三、不同MDSCs亚群对T淋巴细胞增殖的体外抑制功能

为验证上述具有MDSCs表型的细胞亚群是否具有调节获得性免疫的功能, 阐明MDSC-G和MDSC-M的免疫功能差异, 本研究分别分选LPS造模7 d后小鼠骨髓的不同MDSCs细胞亚群, 并与荧光染料CFSE标记的正常小鼠脾CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞在抗-CD3/CD28刺激下, 混合培养60 h, 评价不同MDSCs亚群对CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞增殖的抑制作用。如表1所示, 脓毒症小鼠模型骨髓MDSC-G和MDSC-M均表现出很强的抑制CD4<sup>+</sup>T细胞增殖的能力, 随着共培养细胞中MDSCs比例的逐渐增加, CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖受到显著抑制, 见表1。





注: A: 脓毒症各阶段小鼠骨髓总MDSCs比例(CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>)及其亚群MDSC-G和MDSC-M比例动态流式检测; B: 脓毒症各阶段小鼠外周血和脾脏总MDSCs比例和亚群比例动态变化。与正常对照组小鼠相比较

图2 不同分化方向的MDSCs亚群在不同阶段脓毒症小鼠各组织中的动态变化

表1 与不同比例MDSCs亚群细胞混合培养后CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞增殖指数(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDSC : CD4				
	0 : 1	1 : 4	1 : 2	1 : 1	2 : 1
MDSC-G	100	95.50 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>	72.81 $\pm$ 2.36 <sup>b</sup>	48.26 $\pm$ 3.18 <sup>c</sup>	34.07 $\pm$ 4.02 <sup>d</sup>
MDSC-M	100	57.90 $\pm$ 1.52 <sup>e</sup>	47.35 $\pm$ 1.16 <sup>f</sup>	17.17 $\pm$ 2.06 <sup>g</sup>	15.25 $\pm$ 1.92 <sup>h</sup>

注: 与未加MDSCs的阳性对照组PI值相比, <sup>a</sup>:  $t = 2.687, P = 0.0548$ ; <sup>b</sup>:  $t = 18.38, P < 0.0001$ ; <sup>c</sup>:  $t = 26.90, P < 0.0001$ ; <sup>d</sup>:  $t = 27.56, P < 0.0001$ ; <sup>e</sup>:  $t = 40.01, P < 0.0001$ ; <sup>f</sup>:  $t = 59.47, P < 0.0001$ ; <sup>g</sup>:  $t = 62.56, P < 0.0001$ ; <sup>h</sup>:  $t = 67.94, P < 0.0001$

## 讨 论

脓毒症是由感染引起的全身炎症免疫综合征, 尽管脓毒症由不同种类的病原微生物引发, 但患者表现的免疫应答异常却基本相同, 主要为早期的免疫过度激活引发的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和随后的代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)以抑制过度炎症反应。随着病情的发展, 如果抗炎反应占主导地位, 患者常在病情控制数天或数周后可出现广泛的免疫抑制, 继发二次感染导致死亡<sup>[11-12]</sup>。本研究采用高剂量LPS腹腔重复注射方式, 模拟脓毒症不同免疫反应阶

段<sup>[13]</sup>。LPS注射后1 d, 模型小鼠血浆Th1和Th2型细胞因子均明显升高, 提示该动物模型处于免疫系统过度激活期。随着感染不断进展, 血浆Th1型细胞因子显著下降, 至建模7 d后, 大部分Th1型细胞因子均降至正常水平, 与之相对应的则是Th2型细胞因子IL-10的持续增加。提示LPS连续注射7 d后, 模型小鼠进入免疫系统广泛抑制期<sup>[14]</sup>。

在天然免疫过度激活和免疫抑制的发生发展中, 多种免疫细胞起到了重要作用。新近研究发现, 感染导致骨髓造血系统产生多种具有免疫抑制功能的髓系抑制细胞可能在其中起到了重要作用<sup>[18]</sup>。这些细胞均来源于骨髓髓系造血细胞, 是包含粒细胞、单核细胞、树突状细胞等多种髓系细胞的混

合群体,虽然处于不同分化方向,但均具有广泛的免疫抑制功能,其命名逐渐采用“髓系抑制细胞(MDSCs)”<sup>[6]</sup>。MDSCs的存在和功能已经得到了免疫学界的公认,但MDSCs的基础理论研究和临床应用都面临着一个相同的问题:从血液发生学角度看,MDSCs均来源于共同的髓系祖细胞,是一个混杂的细胞群体,主要包括两种不同分化方向的细胞:粒细胞源性和单核细胞源性。由于缺乏特异性标记物,小鼠MDSCs一直被笼统地以CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>这一混杂的细胞群体来研究<sup>[4]</sup>。虽已有报道根据Ly6G和Ly6C的表达差异,将肿瘤小鼠模型MDSCs分为单核细胞(MDSC-M)和粒细胞(MDSC-G)两个亚群<sup>[9]</sup>,但是这两种标记物在脓毒症模型中的确切表达模式至今尚不完全明确。本研究小组在既往研究转录因子Gfi1(growth factor independence 1, Gfi1)调控髓系造血的基础上,利用Gfi1基因在粒细胞和单核细胞转录水平的表达差异,创建了从Gfi1:GFP“基因敲入”(knock-in)小鼠骨髓中分离高纯度小鼠幼稚粒细胞和幼稚单核细胞的方法。本研究沿用这一技术,成功完成了MDSC-G和MDSC-M的分离纯化工作,并以此为基础比较了不同分化方向MDSCs的功能差异。

感染作为诱导MDSC生成的重要因素,不仅增加了MDSC的数目,而且改变了MDSC的分化方向<sup>[15]</sup>。与正常髓系造血相比,TLR4介导的应激髓系造血向粒细胞分化方向倾斜,该MDSC-G具有明显的T淋巴细胞增殖抑制功能。可见,MDSC-G是脓毒症诱导的主要MDSCs细胞,在脓毒症由免疫激活向免疫抑制转化过程中发挥了重要作用,是造成脓毒症免疫麻痹的重要MDSCs亚群。

综上所述,本研究认为不同分化方向的MDSCs在脓毒症的不同阶段承担不同的作用;预防和治疗免疫抑制应针对不同阶段、不同来源的MDSCs。

### 参 考 文 献

1 Silva E, Passos RH, Ferri MB, et al. Sepsis: from bench to bedside.

Clinics,2008,63(1):109-120.

2 Ward PA. Immunosuppression in sepsis. JAMA,2011,306(23):2618-2619.

3 Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res,2007,67(1):425-426.

4 Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol,2009,9(3):162-174.

5 Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol,2012,12(4):253-268.

6 Frey AB. Myeloid suppressor cells regulate the adaptive immune response to cancer. J Clin Invest,2006,116(10):2587-2590.

7 Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer,2008,8(8):618-631.

8 Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 (+) CD11b (+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. J Exp Med,2007,204(6):1463-1474.

9 Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. J Immunol,2008,181(8):5791-5802.

10 Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. Curr Opin Immunol,2010,22(2):238-244.

11 Cameron MJ, Ran L, Xu L, et al. Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. J Virol,2007,81(16):8692-8706.

12 Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. J Immunol,2006,177(3):1967-1974.

13 Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. Shock,2005,24(Suppl 1):7-11.

14 Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov,2005,4(10):854-865.

15 Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. Immunity,2006,24(6):801-812.

(收稿日期: 2013-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

王蓓蓓, 贾蓓, 曾辉. 脂多糖腹腔重复注射诱导脓毒症小鼠髓系抑制细胞的生成[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 340-344.