

· 基础论著 ·

脂多糖所致脓毒症诱导的急性肺损伤肺组织 T 淋巴细胞活化及共刺激分子表达的研究

林涛^{1,2} 孔雅娴^{1,2} 贾蓓^{1,2} 刘三海³ 胡小玲⁴ 曾辉^{1,2}

【摘要】目的 研究腹腔注射脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肺损伤(ALI)模型肺组织T淋巴细胞活化状态。**方法** 健康雄性C57BL/6随机分为生理盐水(NS)腹腔注射组, LPS腹腔注射组, 每组4只。模型建立后3 h, 获取两组小鼠肺组织细胞并进行T淋巴细胞各亚群及活化指标染色, 采用流式细胞术检测。**结果** 与对照组(NS)相比, LPS腹腔注射组小鼠肺组织内抑制性共刺激分子PD-1、CD40/CD40L、CTLA-4在CD4⁺和CD8⁺T细胞表达水平均显著升高($P < 0.05$), 协同共刺激分子CD28(MFI: 298.50 ± 4.44)表达水平降低; 与对照组相比, 早期活化分子CD69在LPS诱导的急性肺损伤模型小鼠肺组织内CD4⁺T(MFI: 848.30 ± 95.57 ; $t = 6.8670$, $P < 0.001$)和CD8⁺T淋巴细胞的表达水平显著升高(MFI: 606.00 ± 95.54 ; $t = 4.8780$, $P < 0.01$); 晚期活化分子CD38在CD4⁺T细胞表达显著升高(MFI: 69.38 ± 2.86 ; $t = 4.1150$, $P < 0.01$), 在CD8⁺T细胞表达无明显升高。**结论** LPS诱导的急性肺损伤能够导致肺组织内T淋巴细胞早期活化, 并且能够上调其多种抑制性共刺激分子表达, 提示T淋巴细胞可能在ALI中发挥重要作用。

【关键词】 脂多糖; 急性肺损伤; 共刺激分子; 活化

Activation of T lymphocytes and its expression of co-stimulatory molecules in acute lung injury induced by lipopolysaccharide caused sepsis Lin Tao^{1,2}, Kong Yaxian^{1,2}, Jia Bei^{1,2}, Liu Sanhai³, Hu Xiaoling⁴, Zeng Hui^{1,2}.

¹Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China;

²Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; ³School of Basic Medical

Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ⁴Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

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

【Abstract】 Objective To investigate the activation of T lymphocytes in mouse model of acute lung injury (ALI) which induced by intraperitoneal injection of LPS. **Methods** Male mice were randomly divided into two groups: normal saline (NS)-IP and lipopolysaccharide (LPS)-IP. The mice of NS-IP and LPS-IP groups were exposed to NS and LPS via intraperitoneal injection, respectively. The activation of T lymphocytes, which migrated into lung, was analyzed by flow cytometer at 3 h after NS-IP and LPS-IP, respectively. **Results** Compared with the control group, the ALI group expressed higher co-stimulatory molecules PD-1, CD40/CD40L and CTLA-4 on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells significantly ($P < 0.05$). Moreover, LPS administration caused a high expression of an early activation marker CD69 on CD4⁺ T (MFI: 848.30 ± 95.57 ; $t = 6.8670$, $P < 0.001$) and CD8⁺ T cells (MFI: 606.00 ± 95.54 ; $t = 4.8780$, $P < 0.01$). In addition to CD69, another activation marker CD38 also had been highly expressed on CD4⁺ T cells (MFI: 69.38 ± 2.86 ; $t = 4.1150$, $P < 0.01$), while a significantly high expression can not be found on CD8⁺ T cells. **Conclusions** In this ALI model, T cells could be activated in lung tissue, and the high expression of multiple inhibitor co-stimulatory molecules suggests T lymphocytes may play an important role in the pathological process of ALI.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Acute lung injury (ALI); Co-stimulatory molecules; Activation

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.02.031

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81372095)

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¹; 100015 北京, 新发突发传染病研究北京市重点实验室²; 100029 北京, 北京中医药大学基础医学院³; 100730 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院呼吸科⁴

通讯作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由源性以外的各种直接和间接致伤因素导致的肺泡上皮细胞以及毛细血管内皮细胞损伤。ALI 可造成弥漫性肺间质及肺泡水肿, 引发急性低氧性呼吸功能不全, 临床上表现为进行性低氧血症和呼吸窘迫, 病情发展至严重阶段 (氧合指数 < 200) 被称为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]。ARDS 发病率和病死率较高, 病死率高达 40% ~ 70%^[2], 是重症监护病房常见的危重症和主要死亡原因之一。

既往研究一直把天然免疫细胞作为导致急性肺损伤发生的关键因素。但作为机体重要的免疫细胞, T 淋巴细胞在 ALI 中的作用越来越受到重视。Morris 等^[3] 和 Nakajima 等^[4] 均发现在内毒素诱导的肺损伤模型中, 除了中性粒细胞之外, 还有 T 淋巴细胞在肺内聚集。目前研究对 T 淋巴细胞在 ALI 中的作用机制尚不清楚。LPS 是内毒素的主要成分, 为革兰阴性菌致 ALI 的主要致病物质, 在 ALI 的体内实验研究中, 常常作为致伤剂建立 ALI 动物模型。为了更深入地研究 ALI, 本研究应用 LPS 致脓毒症小鼠, 观察 ALI 时迁移至肺的 T 细胞活化状态改变, 报道如下。

材料与方法

一、实验动物

本研究采用 SPF 级 6 ~ 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠, 体重 20 ~ 23 g, 购于中国医学科学院动物所 (许可证号: SCXK 京 2009-0007)。

二、试剂和材料

抗 -CD4-BV421、抗 -CD8-CF-594、抗 -CD69-FITC、抗 -CD28-PE、抗 -CD40-FITC、抗 -CD40L-PE、抗 -CD152-PE、抗 -PD-1-FITC、抗 -CD38-FITC 和抗 -CD25-PE 均购自 BD 公司。

三、方法

1. 建立小鼠急性肺损伤模型: 根据 Chen 等^[5] 报道的方法采用小鼠腹腔注射 LPS (10 mg/kg) 建立小鼠肺损伤模型。对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。

2. 制备小鼠肺组织单细胞悬液: 分别于腹腔注射生理盐水和脂多糖后 3 h 处死小鼠, 经心脏左心室推入生理水 10 ml, 使生理盐水代替小鼠体循环及肺循环血液。取双侧肺组织, 用流式细胞染色液 2 ml, 在 Cell Strainer (BD 公司) 中将其研磨、过滤制备成单细胞悬液。

3. 流式细胞染色: 将两组小鼠肺组织单细胞

表 1 多种共刺激分子在 CD4⁺T 细胞表达的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PD-1 (MFI)	CTLA-4 (MFI)	CD40 (MFI)	CD40L (MFI)
对照组	4	73.90 ± 13.51	189.60 ± 53.53	47.48 ± 5.78	104.70 ± 7.44
ALI 组	4	140.30 ± 11.27	600.80 ± 68.56	115.60 ± 15.81	322.00 ± 60.43
<i>t</i>		3.7700	4.7270	4.0450	3.5690
<i>P</i>		0.0093	0.0032	0.0068	0.0118

表 2 多种共刺激分子在 CD8⁺T 细胞表达的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PD-1 (MFI)	CTLA-4 (MFI)	CD40 (MFI)	CD40L (MFI)
对照组	4	80.48 ± 16.27	169.41 ± 40.00	70.00 ± 11.42	115.40 ± 6.98
ALI 组	4	138.00 ± 11.17	363.00 ± 38.89	144.81 ± 14.10	218.00 ± 40.27
<i>t</i>		2.9150	3.3710	4.1200	2.5110
<i>P</i>		0.0268	0.0119	0.0062	0.0458

表 3 多种活化标志分子在 CD4⁺T 细胞表达的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD28 (MFI)	CD25 (MFI)	CD69 (MFI)	CD38 (MFI)
对照组	4	315.50 ± 8.49	7.49 ± 2.27	149.71 ± 34.88	62.25 ± 1.44
ALI 组	4	298.50 ± 4.44	5.97 ± 1.73	848.30 ± 95.57	75.90 ± 2.98
<i>t</i>		1.7740	0.5323	6.8670	4.1150
<i>P</i>		0.1624	0.6136	0.0005	0.0063

表 4 多种活化标志分子在 CD8⁺T 细胞表达的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD28 (MFI)	CD25 (MFI)	CD69 (MFI)	CD38 (MFI)
对照组	4	141.80 ± 4.27	5.36 ± 1.56	128.90 ± 20.90	66.65 ± 3.19
ALI 组	4	113.30 ± 4.69	4.85 ± 1.14	606.00 ± 95.54	69.38 ± 2.86
<i>t</i>		4.4900	0.2657	4.8780	0.6353
<i>P</i>		0.0041	0.7994	0.0028	0.5487

悬液定容至 1 ml, 取 200 μ l 进行流式细胞染色 15 min, 流式染色液清洗后利用 FACS Aria II 流式细胞仪进行检测。数据分析采用 FlowJo 7.6.1 软件, 分析方法为: 通过抗 -CD4-BV421 和抗 -CD8-CF-594 分出 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞, 通过抗 -CD69-FITC、抗 -CD28-PE、抗 -CD40-FITC、抗 -CD40L-PE、抗 -CD152-PE、抗 -PD-1-FITC、抗 -CD38-FITC 和抗 -CD25-PE 检测 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞活化及共刺激分子的表达。

四、统计学处理

采用 GraphPad Prism V 5.01 软件系统对数据进行统计分析。各组数据行正态性检验, 正态性数据用 $\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、LPS 刺激导致多种共刺激分子在小鼠肺组织 T 淋巴细胞表达升高

为了研究 LPS 刺激对小鼠肺部 T 细胞功能的影响, 采用流式细胞术对共刺激分子 PD-1、CD40L/CD40 和 CTLA-4 在正常对照组与 LPS 组小鼠肺组织 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的表达情况进行检测。结果显示: 与对照组相比, 共刺激分子 PD-1、CD40/CD40L 以及 CTLA-4 在 CD4⁺ T 细胞表达的平均荧光强度均显著

升高 ($P < 0.05$); 在 CD8⁺ T 细胞表达的平均荧光强度同样显著高于正常对照组在 ($P < 0.05$), 表 1 ~ 2。提示 LPS 刺激能够导致多种共刺激分子在小鼠肺组织表达升高。

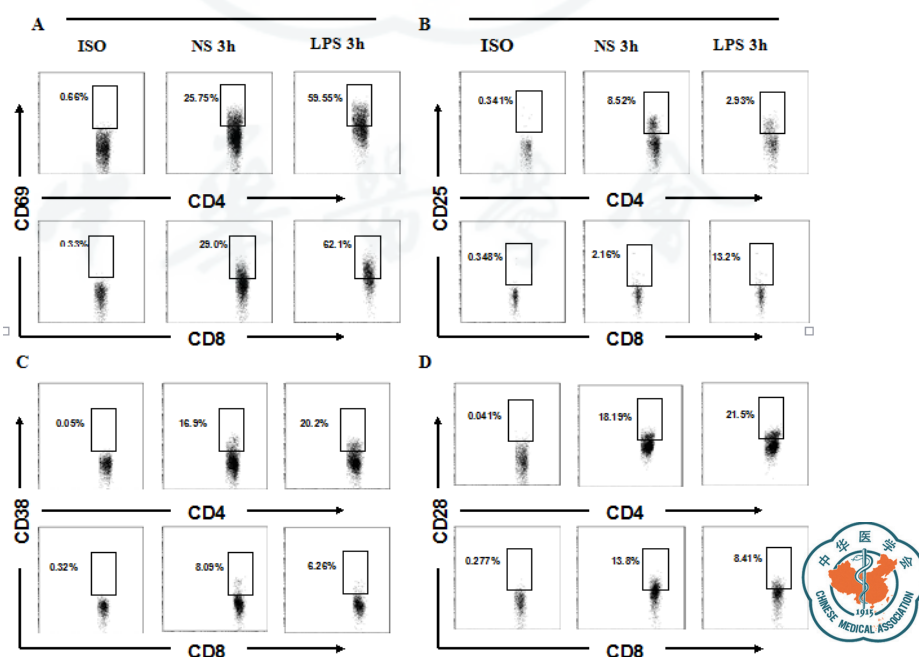
二、LPS 刺激导致多种活化分子在小鼠肺组织 T 淋巴细胞的表达升高

为了进一步研究 LPS 刺激对小鼠肺组织 T 细胞活化状态的影响, 我们同样采用流式细胞术对活化分子 CD69、CD38、CD28 及 CD25 在对照组和 LPS 组小鼠肺组织 T 细胞的表达情况进行检测。

结果发现, 与对照组相比, LPS 刺激导致 CD69 在肺组织 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞表达的平均荧光强度均显著升高 ($P < 0.05$), 见图 1; CD38 在 CD4⁺T 淋巴细胞表达的平均荧光强度显著升高 ($P < 0.001$), 但其在 CD8⁺ T 细胞的升高无统计学差异。与对照组相比, CD25 在 LPS 组肺组织 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表达的平均荧光强度无显著性变化; CD28 在 CD8⁺ T 细胞的表达显著水平降低 ($P < 0.001$), 表 3 ~ 4。提示 LPS 刺激能够导致小鼠肺组织 T 细胞活化程度升高。

讨 论

急性肺损伤时, 中性粒细胞在肺组织中大量聚集被认为是导致 ALI 发生的关键因素^[3, 6]。本研究发



注: A: 活化分子CD69在对照组和LPS腹腔注射组小鼠肺组织CD4⁺和CD8⁺T细胞表达情况。B: 活化分子CD25在对照组和LPS腹腔注射组小鼠肺组织CD4⁺和CD8⁺T细胞表达情况。C: 活化分子CD38在对照组和LPS腹腔注射组小鼠肺组织CD4⁺和CD8⁺T细胞表达情况。D: 共刺激分子CD28在对照组和LPS腹腔注射组小鼠肺组织CD4⁺和CD8⁺T细胞表达情况。ISO: 同型对照, NS: 生理盐水, LPS: 脂多糖 (每组小鼠 $n=4$)

图1 不同组别CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞CD69、CD28、CD38及CD25的表达流式图

现,在LPS所致脓毒症诱导的ALI模型中,抑制性共刺激分子CD40/CD40L、PD-1及CTLA-4,在肺CD4⁺T和CD8⁺T细胞的表达趋势具有一致性,均显著升高($P < 0.05$),但协同共刺激分子CD28表达下调。本研究还发现活化标志分子CD69、CD25和CD38在肺CD4⁺T、CD8⁺T细胞的表达趋势不一致,即早期活化分子CD69在肺T淋巴细胞的表达显著升高,而晚期活化分子CD25和CD38表达不升高。

CD40/CD40L、PD-1 (programmed death-1) /PD-L1 (ligand for PD-1) /PD-L2、CTLA-4/CD80/86和HVEM/BTLA/CD160等^[7-9]是已经被证实的抑制性共刺激分子。肿瘤坏死因子家族成员CD40L,与巨噬细胞表面的受体CD40相互作用,抑制IL-1 β 的剪切、成熟,降低IL-1 β 分泌,进而调控天然免疫反应^[10]。程序性细胞死亡受体1(PD-1)与配体PD-L1结合后,可以阻滞细胞周期,抑制CD4⁺T和CD8⁺T细胞的增殖并诱导T细胞的无功能或耗竭^[7-8]。CTLA-4与配体结合后直接抑制AKT活化,与PD-1具有相似的抑制功能。本研究发现,抑制性共刺激分子CD40/CD40L、PD-1及CTLA-4在CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞的表达均显著升高。故推测,在LPS所致脓毒症诱导的急性肺损伤模型中,肺组织T淋巴细胞可能通过其表面配体与天然免疫细胞表面受体结合,激活抑制性信号,减少多种炎症细胞因子的释放,调控天然免疫炎症反应,进而达到缓解急性肺损伤的作用。

CD69是C-型凝集素受体家族成员,是T淋巴细胞激活后最早表达的表面抗原,其在受到PMA、LPS及C-反应蛋白等刺激物刺激时表达水平显著升高^[11],类似的蛋白还包括IL-2受体CD25^[12]。CD38作为一种II型跨膜糖蛋白,是一种经典的活化标志分子,表达上调提示细胞处于活化状态。与CD69不同,CD38和CD25主要表达在处于较晚活化时期的T淋巴细胞。LPS刺激导致CD69在小鼠肺组织CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞的表达水平显著升高,提示LPS诱导的小鼠肺急性损伤导致肺组织的T淋巴细胞大量活化,且以早期活化为主。

CD28分子是迄今为止所发现的能促使T淋巴细胞活化最重要的共刺激分子,表达于静止的CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞,与配体B7的结合对免疫应答的启动,维持和下调都有重要作用^[14]。本研究发现,LPS刺激后,CD28在小鼠肺T细胞表达下调。与对照组相比,ALI组肺CD8⁺T淋巴细胞的CD28表达下调具有显著统计学意义($P <$

0.01)。有研究报道,PD-1能够干扰CD28信号通路下游分子PI3K活化,进一步抑制AKT的磷酸化,最终导致IL-2生成减少,抑制T细胞增殖并诱导T细胞无功能或耗竭。CTLA-4与配体结合后直接抑制AKT活化,与PD-1具有相似的抑制功能,但这种抑制作用较弱。CD28表达下调可能是因为PD-1,CTLA-4等抑制性共刺激分子的表达竞争性升高导致^[15-16]。

本研究中,T淋巴细胞在肺组织的大量早期活化及抑制性共刺激分子的过度表达,提示T淋巴细胞在LPS诱导的ALI可能具有重要的作用。

参考文献

- 1 Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders[J]. Shock,2006,25(1):4-11.
- 2 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. N Engl J Med,2005,353(16):1685-1693.
- 3 Morris PE, Glass J, Cross R, et al. Role of T-lymphocytes in the resolution of endotoxin-induced lung injury[J]. Inflammation,1997,21(3):269-278.
- 4 Nakajima T, Suarez CJ, Lin KW, et al. T cell pathways involving CTLA4 contribute to a model of acute lung injury[J]. J Immunol,2010,184(10):5835-5841.
- 5 Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine[J]. Expert Rev Respir Med,2010,4(6):773-783.
- 6 Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, et al. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury[J]. Vascu Pharmacol,2008,49(4-6):119-133.
- 7 Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance[J]. Ann N Y Acad Sci,2011,12(17):45-59.
- 8 Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. Immunol Rev,2010,23(6):219-242.
- 9 Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity[J]. Autoimmun Rev,2013,12(11):1091-1100.
- 10 Kim KD, Zhao J, Auh S, et al. Adaptive immune cells temper initial innate responses[J]. Nat Med,2007,13(10):1248-1252.
- 11 Lindsey WB, Lowdell MW, Marti GE, et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery[J]. Cytotherapy,2007,9(2):123-132.
- 12 Hasegawa A, Nakayama T. Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi,2010,33(4):189-195.
- 13 Wei W, Graeff R, Yue J. Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway[J]. World J Biol Chem,2014,5(1):58-67.
- 14 Leung J, Suh WK. The CD28-B7 Family in anti-tumor immunity: emerging concepts in cancer immunotherapy[J]. Immune Netw,2014,14(6):265-276.
- 15 Podojil JR, Miller SD. Targeting the B7 family of costimulatory molecules: successes and challenges[J]. Bio Drugs,2013,27(1):1-13.

(收稿日期: 2014-10-27)

(本文编辑: 孙荣华)

林涛, 孔雅娴, 贾蓓, 等. 脂多糖所致脓毒症诱导的急性肺损伤肺组织T淋巴细胞活化及共刺激分子表达的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(2): 272-275.