

脓毒症患者外周血调节性V δ 1 T细胞比例及功能变化

谢 谦,周 丽

(新疆医科大学附属中医院重症医学科,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:观察脓毒症患者外周血V δ 1 T细胞数量和功能的改变,初步探讨V δ 1 T细胞在脓毒症发病中的作用。方法:选取2013年12月—2014年12月在本院ICU入住的脓毒症患者40例及同期入院进行健康体检者(health control,HC)40例,清晨空腹抽取外周静脉血10 mL。采用流式细胞术测定其外周血V δ 1 T细胞比例及V δ 1 T细胞表面Foxp3表达情况,采用CFSE染色方法检测V δ 1 T细胞对CD4⁺T细胞增殖能力的影响,采用流式细胞术测定V δ 1 T细胞与CD4⁺T细胞共孵育后对CD4⁺T细胞分泌 γ -干扰素(interferon γ ,IFN- γ)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α ,TNF- α)能力的影响。结果:脓毒症患者外周血V δ 1 T细胞数量(3.35 \pm 0.55)%与HC(1.04 \pm 0.22)%相比显著升高($P < 0.01$)。与HC外周血V δ 1 T细胞表面Foxp3表达水平(10.02 \pm 2.31)%相比,脓毒症患者外周血V δ 1 T细胞表面Foxp3表达水平(16.83 \pm 3.63)%显著升高($P < 0.01$)。HC外周血V δ 1 T细胞对CD4⁺T细胞增殖、分泌IFN- γ 和TNF- κ 的抑制百分率分别为(44.26 \pm 6.31)%、(34.84 \pm 4.83)%和(39.31 \pm 4.91)%、脓毒症患者外周血V δ 1 T细胞对CD4⁺T细胞增殖、分泌IFN- γ 和TNF- κ 的抑制百分率分别为(62.35 \pm 5.91)%、(50.37 \pm 4.77)%和(54.94 \pm 5.71)%。提示,脓毒症外周血V δ 1 T细胞较HC外周血V δ 1 T细胞具有更强的免疫抑制功能($P < 0.01$)。结论:脓毒症患者外周血V δ 1 T细胞免疫抑制功能增强,致使脓毒症患者免疫功能受到抑制,脓毒症患者免疫功能的这种改变可能与脓毒症的发生相关。

[关键词] 脓毒症;外周血;T细胞;比例;功能

[中图分类号] R631

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)01-073-04

doi:10.7655/NYDXBNS20160115

Changes of number and function of peripheral blood V δ 1 T cells in patients with sepsis

Xie Qian, Zhou Li

(ICU, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe changes of the number and function of peripheral blood V δ 1 T cells in patients with sepsis, and preliminary study on the role of V δ 1 T cells in the pathogenesis of sepsis. **Methods:** A total of 40 patients with sepsis who underwent ICU treatment and 40 healthy controls (HC) who underwent physical examination in authors' affiliated hospital from December, 2012 to December, 2014 were enrolled in this study. Peripheral venous blood samples (10 mL) were taken from both groups. The proportion of V δ 1 T cells and Foxp3 expression on V δ 1 T cells were detected by flow cytometry (FCM). The inhibition effect of V δ 1 T cells on CD4⁺T cell proliferation was detected by CFSE staining. After coculture for 72 h, the inhibition effects of V δ 1 T cells on the IFN- γ and TNF- α production ability of CD4⁺T cell were detected by FCM. **Results:** The proportion of V δ 1 T cells in HC was (1.04 \pm 0.22)%, and in sepsis was (3.35 \pm 0.55)%, the proportion of V δ 1 T cells between HC and sepsis had statistical significance ($P < 0.01$). The proportion of Foxp3 expression on V δ 1 T was (10.02 \pm 2.31) % in HC, and was (16.83 \pm 3.63)% in sepsis, the proportion of Foxp3 expression on V δ 1 T between HC and sepsis had a statistical significance ($P < 0.01$). The inhibitory effect of V δ 1 T cells from HC on the proliferation, IFN- γ and TNF- α production ability of CD4 T cell were (44.26 \pm 6.31)%, (34.84 \pm 4.83)% and (39.31 \pm 4.91)%, respectively; and the inhibitory effect of V δ 1 T cells from sepsis on the proliferation, IFN- γ and TNF- α production ability of CD4 T cell were (62.35 \pm 5.91)%, (50.37 \pm 4.77)% and (54.94 \pm 5.71)%, respectively. The inhibitory effect of V δ 1 T cells between HC and sepsis had a statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion:** V δ 1 T cells from sepsis have strong inhibitory function, resulting in immune function inhibition, finally resulting in sepsis.

[Key words] sepsis; peripheral blood; T cells; proportion; function

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(01): 073-076, 79]

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 临床上证实有细菌存在或有高度可疑感染灶。尽管脓毒症在临床上有标准的治疗方法, 然而其仍是重症患者死亡的重要原因^[1-5]。研究证实, 机体免疫反应的减弱使得细菌不能有效清除是脓症患者病情加重的主要原因^[6]。调节性T细胞(regulatory T cells, Treg) 是一群具有免疫抑制功能的细胞, Treg细胞比例升高或功能增强会使机体免疫功能减弱, 破坏免疫平衡。目前文献中研究较多的与疾病相关的Treg细胞是CD4⁺ Treg, 且已有文献证实CD4⁺ Treg与脓毒症发病密切相关^[7-8]。然而, 除外CD4⁺ Treg, 外周血中还存在多种其他具有免疫抑制功能的细胞, 例如: 调节性B细胞、调节性DC细胞和V δ 1 T细胞等^[9-11]。V δ 1 T细胞是近年来新发现的一种具有免疫抑制功能的T细胞亚群^[11]。目前关于V δ 1 T细胞在脓毒症中的作用还未见文献报道。据此, 本研究观察了脓症患者外周血V δ 1 T细胞数量和功能的改变, 对V δ 1 T细胞在脓毒症发病中的作用进行了初步探讨。

1 对象和方法

1.1 对象

收集2013年12月—2014年12月在新疆医科大学附属中医院重症医学科ICU入住的脓症患者40例及同期入院进行健康体检者40例。所有患者均符合2001年12月美国华盛顿召开的国际脓毒症定义会议所制定的脓毒症诊断标准。脓症患者中, 男25例, 女15例, 平均年龄(59.94 ± 15.63)岁; 脓毒症25例, 严重脓毒症10例, 脓毒症休克5例。健康对照(health control, HC)组中, 男25例, 女15例, 平均年龄(61.02 ± 16.26)岁。该研究中所有研究对象均知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离

枸橼酸钠抗凝管采集的清晨空腹外周血按1:1的比例缓缓加入已预加淋巴细胞分离液的15 mL离心管中(确保血置于淋巴细胞分离液上面), 800 g离心18 min; 无菌滴管吸取淋巴细胞分离液上面的白膜层, 加入装有10 mL无血清RPMI 1640培养基的15 mL离心管中, 600 g离心15 min; 弃去上清, 细胞沉淀以10 mL无血清RPMI 1640培养基重悬, 400 g离心8 min; 再用1 mL含10%胎牛血清的

RPMI1640完全培养基将细胞沉淀重悬, 台盼蓝染色计数后制备成浓度为 2×10^6 个/mL的细胞悬液。

1.2.2 外周血V δ 1 T细胞比例测定

上述获取的PBMC采用含1%BSA的PBS洗涤2次后, 细胞以0.1 mL含1%BSA的PBS重悬, 于液体中加入CD3、TCR V δ 1抗体, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min; 以含1%BSA的PBS洗涤2次后, 细胞重悬于0.1 mL 1%多聚甲醛固定液中待流式细胞仪检测。

1.2.3 V δ 1 T细胞表面Foxp3表达检测

PBMC按上述步骤进行表面分子染色后加入0.5 mL细胞膜固定透化液, 室温避光放置30 min; 以透化液洗涤细胞2次后加入Foxp3抗体, 室温避光30 min; 以透化液洗涤细胞2次, 细胞重悬于0.2 mL 1%多聚甲醛固定液中待流式细胞仪检测。

1.2.4 CFSE细胞增殖检测

PBMC经流式细胞仪分选获取纯度>90%的V δ 1 T细胞和CD4⁺ T细胞。CD4⁺ T细胞以不含血清的10 mL RPMI 1640培养基洗涤1次, 随后加入终浓度为5 mmol/L的CFSE染液, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂培养箱中避光孵育10 min, 随后立即在细胞中加入5 mL预冷的CFSE染色终止液(含5% FBS的RPMI 1640培养基), 冰上放置5 min进行染色终止, 400 g离心8 min, 再以10 mL的RPMI 1640培养基洗涤1次, 细胞以RPMI-1640完全培养基重悬后, 将V δ 1 T细胞和上述CD4⁺ T细胞按1:1比例加入1 μ g/mL CD3抗体及2 μ g/mL CD 28抗体包被的48孔板中, 孵育5 d后收取细胞进行流式细胞仪检测。

1.2.5 V δ 1 T细胞抑制CD4⁺ T细胞的细胞因子分泌能力检测

PBMC经流式细胞仪分选获取纯度>90%的V δ 1 T细胞和CD4⁺ T细胞。将两种细胞按1:1比例加入1 μ g/mL CD3抗体及2 μ g/mL CD28抗体包被的48孔板中, 于37 $^{\circ}$ C 5% CO₂培养箱中共孵育72 h后, 于24孔板中加入cell activation cocktail继续孵育6 h; 收集细胞, 先进行细胞表面分子CD4染色, 后加入0.5 mL细胞膜固定透化液重悬细胞, 室温避光30 min; 以透化液洗涤细胞2次后加入 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)抗体, 室温避光30 min; 以透化液洗涤细胞2次, 细胞重悬于0.2 mL 1%多聚甲醛固定液中以流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件进行数据分析。2组数据间比较采用 t 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 脓毒症患者和 HC 外周血 V δ 1 T 细胞比例变化情况

HC 外周血 V δ 1 T 细胞比例为(1.04 \pm 0.22)%, 脓毒症患者外周血 V δ 1 T 细胞比例为(3.35 \pm 0.55)%, 二者相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 脓毒症患者和 HC 外周血 V δ 1 T 细胞表面 Foxp3 表达水平检测

HC 外周血 Foxp3⁺ V δ 1 T 细胞比例为 (10.02 \pm 2.31)%, 脓毒症患者外周血 Foxp3⁺ V δ 1 T 细胞比例为(16.83 \pm 3.63)%, 二者相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 V δ 1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞增殖能力检测

如图 1 所示,HC 外周血单独 CD4⁺ T 细胞的增

殖水平为(94.93 \pm 7.27)%,V δ 1 T 和 CD4⁺ T 细胞共孵育后 CD4⁺ T 细胞的增殖水平为(50.18 \pm 6.11)%; 脓毒症患者外周血单独 CD4⁺ T 细胞的增殖水平为(94.83 \pm 6.93)%,V δ 1 T 和 CD4⁺ T 细胞共孵育后 CD4⁺ T 细胞的增殖水平为(33.92 \pm 4.62)%。提示, 脓毒症患者外周血 V δ 1 T 细胞的免疫抑制功能较健康对照显著增强($P < 0.01$)。

2.4 V δ 1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞细胞因子分泌能力检测

如图 2 所示,HC 外周血 V δ 1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ 和 TNF- α 分泌的百分率分别为(34.84 \pm 4.83)%和(39.31 \pm 4.91)%,脓毒症患者外周血 V δ 1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ 和 TNF- α 分泌的百分率分别为(50.37 \pm 4.77)%和(54.94 \pm 5.71)%。提示, 脓毒症外周血 V δ 1 T 细胞较 HC 外周血 V δ 1 T 细胞具有更强的免疫抑制功能($P < 0.01$)。

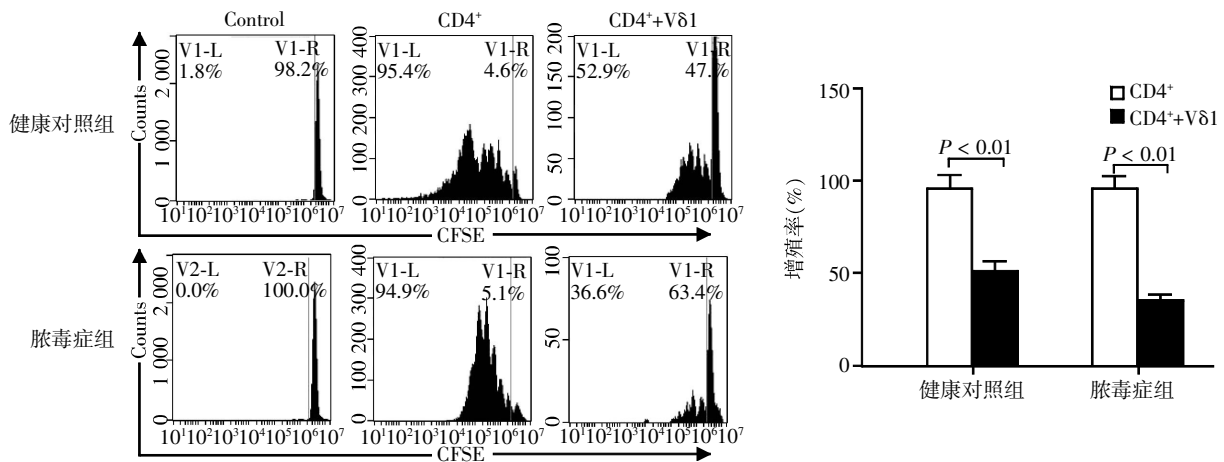


图 1 V δ 1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞增殖能力检测结果

Figure 1 CD4⁺ T cell proliferation inhibited by V δ 1 T cells

3 讨论

脓毒症是因严重感染而导致的临床综合征。脓毒症相关的复杂免疫反应导致脓毒症具有较高的病死率。在 ICU 脓毒症的病死率约 33%,而严重脓毒症则高达 50%。近年来研究发现免疫系统功能的抑制致使细菌不能有效清除在脓毒症的发病中具有重要作用^[6]。Treg 是具有免疫抑制功能的一群细胞,其在维持机体免疫功能平衡中具有重要作用。Wan 等^[12]研究显示,在脓症患者发病初期,CD4⁺ Treg 比例显著升高,且免疫抑制功能亦明显增强。CD4⁺ Treg 细胞比例和功能的改变可能与脓毒症具有较高的病死率相关。吴铁军等^[13]研究显示,脓症患者外周血中 CD4⁺ Treg 比例出现显著升高,致

使 Treg/Th17 比例失衡,且 Treg/Th17 比例失衡参与脓毒症的发病过程。邵敏等^[14]研究显示,脓症患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞比例显著增加,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞比例的增加可导致 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平降低,从而使机体免疫功能处于抑制状态,进而参与了脓毒症的发病。

然而,在机体外周血中除 CD4⁺ Treg,还存在多种其他具有免疫抑制功能的调节性细胞,例如:调节性 B 细胞、调节性 DC 细胞和 V δ 1 T 细胞等^[7-9]。V δ 1 T 细胞是近年来被证实具有免疫抑制功能的一种 T 细胞^[9]。目前关于 V δ 1 T 细胞在脓毒症发病中的作用还未见文献报道。本研究结果显示,脓症患者外周血 V δ 1 T 细胞比例为(3.35 \pm 0.55)%,与 HC 外周血 V δ 1 T 细胞比例(1.04 \pm 0.22)%相比显著升高

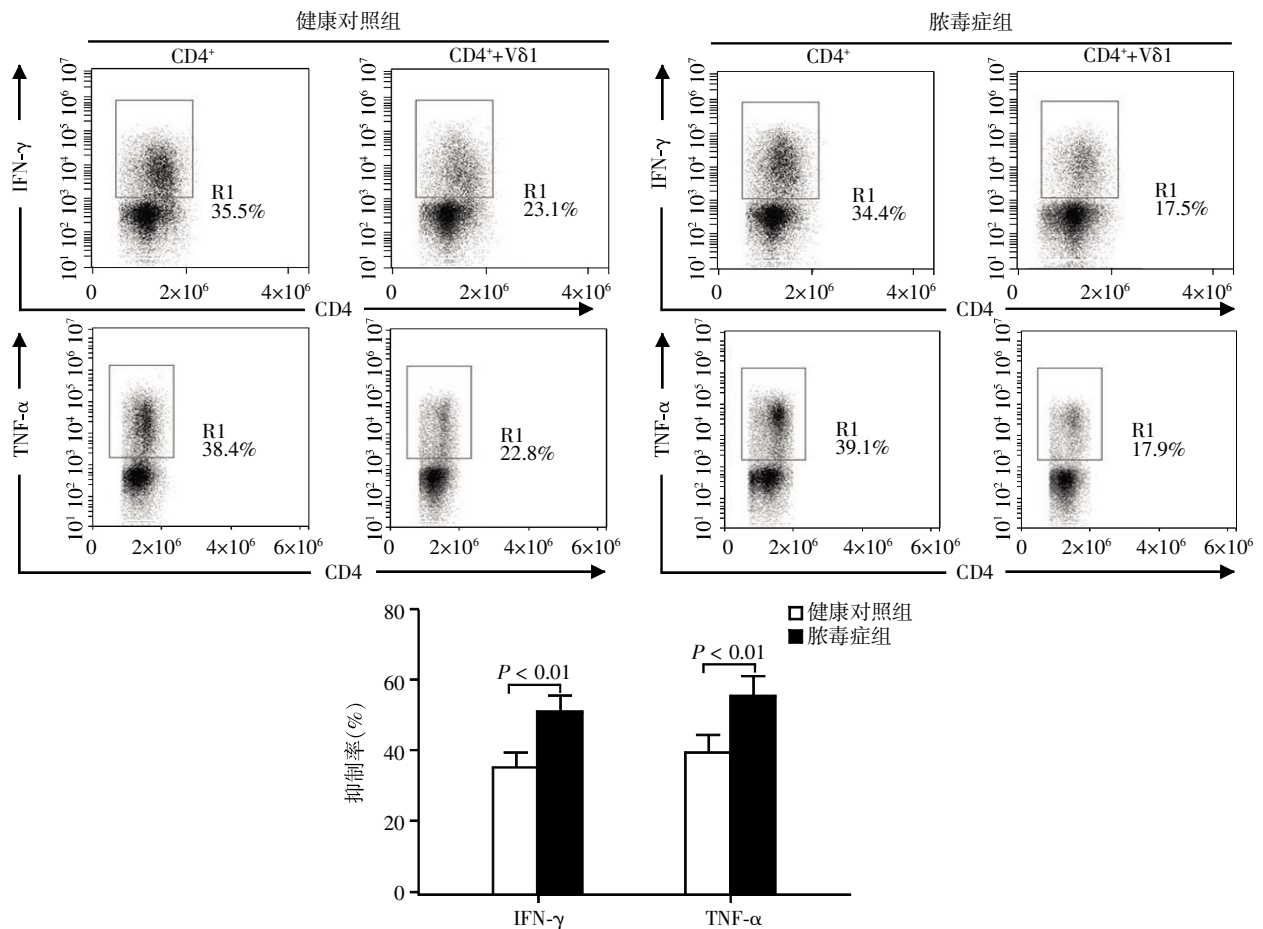


图 2 Vδ1 T 细胞抑制 CD4⁺ T 细胞因子分泌能力

Figure 2 CD4⁺ T cell cytokines secretion inhibited by Vδ1 T cells

($P < 0.01$)。HC 外周血 Vδ1 T 细胞表面 Foxp3 表达水平为 $(10.02 \pm 2.31)\%$ ，脓毒症患者外周血 Vδ1 T 细胞表面 Foxp3 表达水平 $(16.83 \pm 3.63)\%$ ，与健康对照相比，脓毒症患者外周血 Vδ1 T 细胞表面 Foxp3 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。进一步的功能研究发现，HC 外周血 Vδ1 T 细胞对 CD4⁺ T 细胞增殖、分泌 IFN-γ 和 TNF-α 的抑制百分率分别为 $(44.26 \pm 6.31)\%$ 、 $(34.84 \pm 4.83)\%$ 和 $(39.31 \pm 4.91)\%$ ，脓毒症患者外周血 Vδ1 T 细胞对 CD4⁺ T 细胞增殖、分泌 IFN-γ 和 TNF-α 的抑制百分率分别为 $(62.35 \pm 5.91)\%$ 、 $(50.37 \pm 4.77)\%$ 和 $(54.94 \pm 5.71)\%$ 。上述结果提示，脓毒症患者外周血 Vδ1 T 细胞较 HC 外周血 Vδ1 T 细胞具有更强的免疫抑制功能 ($P < 0.01$)，提示 Vδ1 T 细胞比例和功能的这种改变与脓毒症发病密切相关。

综上所述，本研究结果提示，脓毒症患者外周血 Vδ1 T 细胞比例显著升高，且功能显著增强，致使脓毒症患者免疫功能受到抑制，脓毒症患者 Vδ1 T 细胞免疫功能的这种改变可能与脓毒症的发生相关。

[参考文献]

- [1] Guinot PG, Dupont H, Longrois D. Some questioning about the assessment of renal perfusion in sepsis[J]. Crit Care Med, 2015, 43(7): e262-e264
- [2] Sauthoff H, Hay JG. New drug for sepsis on the cheap? [J]. Crit Care Med, 2015, 43(7): 1551-1552
- [3] Higgins TL. Variability in risk-adjusted sepsis mortality: how much is too much? [J]. Crit Care Med, 2015, 43(7): 1530-1531
- [4] Tarakıç N, Dağı HT, Uğur AR, et al. Late-onset *Streptococcus pasteurianus* sepsis in a preterm baby in a neonatal intensive care unit [J]. Turk Pediatri Ars, 2014, 49(2): 157-159
- [5] Acosta-Herrera M, Pino-Yanes M, Blanco J, et al. Common variants of NFE2L2 gene predisposes to acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis [J]. Crit Care, 2015, 19(1): 256
- [6] Chao YH, Wu HP, Wu KH, et al. An increase in CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells after administration of um-