

严重创伤/烧伤后树突细胞变化及调节措施的研究进展

王星玉¹ 唐欣¹ 陈涛¹ 梁华平^{1,2}

¹遵义医学院附属医院重症医学科,贵州遵义 563003; ²陆军军医大学大坪医院野战外科研究所,创伤烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042

通信作者:梁华平,Email:13638356728@163.com

【摘要】 严重创伤、大面积深度烧伤可导致与脓毒症、多器官功能衰竭相关的显著的免疫抑制。树突细胞(DC)作为专职抗原呈递细胞和免疫应答的激活因子,在启动和调节先天免疫及适应性免疫反应中发挥着重要作用。本文对DC细胞在创伤/烧伤后数量、功能变化及相关分子机制与逆转措施进行综述,以期对深入研究创伤/烧伤后DC细胞的变化规律,发掘创伤/烧伤的有效干预措施提供参考。

【关键词】 创伤; 烧伤; 树突细胞

基金项目: 国家自然科学基金(81671906);重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0159)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.025

Progress on changes and regulation measures of dendritic cell after severe trauma/burn

Wang Xingyu¹, Tang Xin¹, Chen Tao¹, Liang Huaping^{1,2}

¹Department of Intensive Care Unit, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China;

²State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Army Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Liang Huaping, Email: 13638356728@163.com

【Abstract】 Severe trauma or massive deep burn can cause significant immunosuppression associated with sepsis and multiple organ failure. Dendritic cell (DC), as the professional antigen presenting cells and activating factor of immune response, plays an extraordinary role in initiating and regulating congenital and adaptive immune response. The quantity, functional changes, relevant molecular mechanisms and reverse measures of DC after trauma/burn were reviewed in order to intensively study the changes of DC after trauma/burn and provide a reference for exploring effective intervention measures for trauma/burn.

【Key words】 Trauma; Burn; Dendritic cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81671906); Basic Science and Frontier Technology Research Projects in Chongqing (cstc2017jcyjAX0159)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.025

严重创伤/烧伤可引起机体局部组织或全身各系统发生一系列病理生理变化,其中免疫紊乱可导致伤后脓毒症、多器官功能损伤及高病死率^[1-2]。作为免疫系统重要成员之一的树突细胞(DC)是最有效的专职抗原呈递细胞(APC),在先天免疫和适应性免疫系统的启动及调节中具有重要作用^[3]。DC细胞具有细胞吞噬功能,其表面高度表达主要组织相容性复合物II类抗原(MHC II)以及共刺激分子,同时还具有能迁移到淋巴器官并刺激天然T细胞的能力。深入研究严重创伤/烧伤后DC细胞的变化规律,并提出相应的调控措施可为临床创伤/烧伤患者提供新的治疗措施,现就近年来DC细胞在创伤领域中的相关研究进展进行综述。

1 严重创伤/烧伤后脾脏DC细胞数量及功能改变

1.1 严重创伤/烧伤后脾脏DC细胞数量变化: Kawasaki等^[1]报道创伤性失血(T-H)小鼠脾脏DC细胞百分比显著降低;随后Kawasaki等^[1,4]进一步研究发现,与假手术小鼠相比,T-H小鼠脾脏DC细胞早期凋亡细胞的百分比以及晚期凋亡细胞的百分比明显增加,提示细胞凋亡可能是T-H后脾脏DC细胞损失的原因之一。同时有研究证实,严重烧伤后脾脏DC细胞凋亡显著,其表面成熟标志物表达下调,反映

DC细胞成熟度受损^[5]。本课题组前期研究表明,创伤后小鼠脾脏成熟DC细胞百分比比较对照组明显减少,而未成熟脾脏DC细胞百分比明显增多,表明脾脏DC细胞成熟度下降^[6]。

1.2 严重创伤/烧伤后脾脏DC细胞功能改变:严重创伤/烧伤不仅可导致DC细胞的杀菌、吞噬功能减弱,成熟度下降,还可改变其表面MHC II和共刺激分子的表达、抗原呈递能力、迟发型超敏反应(DTH)及细胞因子产生能力。Kawasaki等^[1,4]证实,T-H后小鼠脾脏DC细胞表面MHC II、共刺激分子CD40和CD83的表达均较假手术组显著降低;进一步实验显示,伴清蛋白存在下,T-H小鼠脾脏分离的CD11c阳性细胞刺激T细胞增殖的能力较假手术小鼠明显下降,提示创伤可减弱脾脏DC细胞的抗原呈递能力,且与其成熟度下降、白细胞介素-12(IL-12)分泌受抑有关,与本课题组前期研究结果一致^[6]。

本课题组前期研究结果显示,在小鼠双侧股骨闭合性骨折合并失血模型中,异硫氰酸荧光素(FITC)致敏后,引流淋巴结中FITC⁺细胞、FITC⁺/CD11c⁺细胞和FITC⁺/CD11c⁺/MHC II⁺细胞的百分比均明显降低;同时,与对照组相比,创伤后引流淋巴结的DC细胞刺激同基因淋巴细胞的增殖反

应及 FITC 致敏的 DC 细胞向幼稚受体转移 DTH 的能力均显著受抑^[7],提示 DC 细胞与创伤后 DTH 的降低有密切关系,这可能部分归因于创伤后 DC 细胞向引流淋巴结的运输减少以及 DC 细胞迁移过程中分化与成熟不足。

严重创伤/烧伤可引起脂多糖(LPS)诱导的 DC 细胞因子产生能力下降,如 LPS 诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-6 的生成减少以及 LPS 刺激后脾脏 DC 细胞培养上清中 IL-15 水平明显降低,表明创伤导致脾脏 DC 细胞的 LPS 低反应性^[1,4,8]。已有研究证实,严重创伤后,LPS 刺激下 DC 细胞释放的 IL-12p40 和 IL-12p70 降低,在 LPS 或 IL-12 作用下脾脏 DC 细胞产生 γ -干扰素(IFN- γ)的水平也显著下降^[1]。

2 严重创伤/烧伤后外周血 DC 细胞的改变

根据 β_2 整合素蛋白 CD11c 的表达,外周血 DC 细胞主要分为骨髓样 DC 细胞(mDC)和浆细胞样 DC 细胞(pDC)两个亚群^[9-10]。Henrich 等^[9]提出严重多发伤患者外周血 mDC 细胞亚群急剧下降,mDC 细胞与 pDC 细胞的比值显著降低;此外,这些变化与全身 IL-10 水平增加呈负相关。谢玉刚等^[11]指出,多发伤患者 DC 细胞数量减少,其表面人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)及 CD80、CD86 的表达和诱导 T 淋巴细胞的增殖能力均明显降低。Maier 等^[12]报道,严重创伤患者外周血 mDC 细胞凋亡增加,而 pDC 细胞凋亡不受创伤影响。进一步研究表明,严重创伤后早期外周血 DC 细胞的部分基因转录激活,涉及的基因包括细胞内信号转导基因[如核转录因子- κ B(NF- κ B)、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)]、白细胞三烯途径[如花生四烯酸 5-脂氧合酶(ALOX5)]、趋化因子[如血小板因子 4(CXCL-4)]以及抗凋亡基因(Bcl-2)等^[13],提示创伤后早期 DC 细胞的总体反应特征是抗凋亡介质激活增加,可能是代偿性延长寿命的反应^[12-13]。Geiger 等^[2]发现,严重多发伤患者外周血 DC 细胞的后续基因表达模式,即 C-C 趋化因子 5(CCL5)、C-X-C 趋化因子 5(CXCL5)、金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)及 GUCY1B3 蛋白多肽的基因表达呈一过性增高,且其时间依赖性增加与血清 C-反应蛋白(CRP)水平和总 DC 细胞数量显著相关。

3 创伤/烧伤后 DC 细胞功能改变的分子机制

3.1 MAPK 信号通路: Kawasaki 等^[14]在小鼠创伤合并失血模型中发现,T-H 导致脾脏 DC 细胞的细胞膜表面 Toll 样受体 4(TLR4)-MD-2 表达降低,TLR4-MD-2 阳性细胞百分比也明显减少,脾脏 DC 细胞的 TLR4 mRNA 表达水平显著下降;进一步实验证明,创伤可导致小鼠脾脏 DC 细胞的 MAPK 信号通路激活受抑,其机制之一可能是 TLR4-MD-2 表达下调抑制了 MAPK 的活化;此外,MAPK 还参与了脾脏 DC 细胞的 IL-12 等细胞因子的产生,同时,T-H 后用 TLR2 激动剂酵母聚糖刺激脾脏 DC 细胞也发现其低反应性,提示创伤后 MAPK 信号通路活化和信号转导的改变引起脾脏 DC 细胞的低反应性可能是免疫改变发展的核心。

3.2 内质网应激反应(ERS): ERS 是一种内源性的自我保护机制,它通过调节稳态与凋亡之间的平衡,在几乎所有生命过程中发挥着重要作用。据报道,ERS 参与了免疫细胞的

激活和功能调节,且在体外 DC 细胞的成熟和激活过程中具有重要作用^[15-16]。本课题组前期研究证实,严重热损伤后小鼠脾脏 DC 细胞功能受损并有明显的 ERS,ERS 的两个关键标志物及调节因子免疫球蛋白重链结合蛋白(GRP78)和核转录因子 XBP-1 明显上调;进一步实验显示,XBP-1 基因 RNA 干扰(XBPi)的转基因小鼠遭受烫伤后存活率明显低于野生型(WT)或非靶向茎环寡核苷酸 RNA 干扰(NTi)的转基因小鼠,烧伤诱导的 XBPi 转染小鼠 DC 细胞的 C/EBP 同源蛋白(CHOP)表达和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12(caspase-12)激活水平明显高于 WT 小鼠;同时,烧伤后 XBPi 转染小鼠细胞因子分泌能力(IL-12、TNF- α)受到抑制,脾脏 DC 细胞有效激活 T 细胞的能力被显著削弱,表现为 IFN- γ [辅助性 T 细胞 1 型(Th1)细胞因子]产生减少而 IL-4(Th2 型细胞因子)分泌增加^[5]。这些结果均提示严重烧伤可引起脾脏 DC 细胞过度的 ERS,进而引发 DC 细胞的凋亡和功能紊乱,XBP-1 在 DC 细胞的成熟和免疫调节中起着关键作用。

3.3 v-maf 肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 B(MafB) 信号通路: 严重烧伤患者 HLA-DR 和 CD11c 表达下调,与对照组相比,烧伤患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 MafB 表达显著增高,而锌指蛋白(GATA-1)表达明显降低,该调节因子对 DC 细胞分化至关重要^[17]。烧伤改变了 CD14⁺ 单核细胞的表型,增加了 MafB 的表达,并降低了其向 mDC 细胞的分化。进一步研究表明,通过沉默烧伤患者 PBMCs 中的 MafB,PBMCs 衍生的 mDC 细胞中 GATA-1⁺ 和 HLA-DR⁺ 细胞均明显增加,提示 MafB 在烧伤后单核细胞衍生的 mDC 细胞发展中呈负作用,高 MafB 表达可下调烧伤后单核细胞 HLA-DR 表达,从而导致 mDC 细胞表型受抑^[10]。烧伤小鼠模型研究显示,其骨髓祖细胞中 MafB 沉默可增强 CD11c 和 GATA-1 的表达,提示烧伤后 mDC 细胞缺陷的一个可能机制是通过烧伤诱导骨髓祖细胞中 MafB 过度表达而抑制 GATA-1^[10,18]。

4 创伤/烧伤后 DC 细胞功能受抑的逆转措施

4.1 17 β -雌二醇: Kawasaki 等^[4]报道,T-H 后体内应用 17 β -雌二醇可减少小鼠脾脏 DC 细胞的凋亡、减弱脾脏 DC 细胞受抑的抗原呈递功能,以及使脾脏 DC 细胞受抑的细胞因子产生能力也趋于正常,进而对 T-H 后脾脏 DC 细胞有免疫保护作用;此外,T-H 后给予雌激素受体- α (ER- α) 激动剂丙基吡唑三醇(PPT)也能有效逆转脾脏 DC 细胞的细胞因子产生和抗原呈递能力,提示 17 β -雌二醇对 T-H 后脾脏 DC 细胞功能的有益作用主要是通过 ER- α 介导的。

4.2 IL-15: 体外给予 IL-15 可增加 T-H 后脾脏 DC 细胞产生 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 的能力,还可改善 T-H 诱导脾脏 DC 细胞的 MHC II 和共刺激分子下调以及减弱脾脏 DC 细胞受抑的抗原呈递功能,表明 IL-15 对脾脏 DC 细胞功能的有利作用可能是通过改善 T-H 条件下受抑制的脾脏 DC 细胞成熟而实现的^[8]。而 IL-15 在体内是否具有作用尚有待研究证实。

4.3 1-甲基色氨酸(1-MT): 本课题组前期研究显示,吡啶胺-2,3 双加氧酶(IDO)的特异性抑制剂 1-MT 在体外可呈

剂量依赖性提高脾脏 DC 细胞的抗原呈递能力,且在创伤小鼠 DC 细胞中的表现比正常小鼠更为显著^[6],推测创伤小鼠脾脏 DC 细胞的 IDO 活性增加导致其抗原呈递能力下降,进一步探讨 IDO 在创伤过程中的作用可能为临床治疗提供新的思路。

4.4 大蒜素 (Allicin): Zhang 等^[19]对大鼠创伤/失血性休克 (T/HS) 模型研究显示,大蒜素处理可上调 T/HS 组肠系膜淋巴结 (MLN)-DC 细胞降低的表面 CD80 和 MHC II 表达,进而增强 APC 的功能,并有助于促炎细胞因子的合成,表明大蒜素有助于 MLN-DC 细胞的成熟。大蒜素还可改善 T/HS 诱导 MLN-DC 细胞早期凋亡增加,与 T/HS 组相比, T/HS⁺ 大蒜素组 MLN-DC 细胞中磷酸化蛋白激酶 B/细胞外调节蛋白激酶 (Akt/Erk) 表达明显上调,说明大蒜素通过激活 Akt/Erk 信号通路抑制细胞凋亡。进一步研究证实, T/HS 组与 T/HS⁺ 大蒜素组 MLN 细菌移位差异无统计学意义,但其在肝脏、血液、脾脏细菌移位方面差异有统计学意义。这些结果提示,大蒜素治疗可通过调节 DC 细胞的成熟而增强 MLN 的免疫屏障功能,从而阻断肠道细菌移位。

4.5 沙丁醛 (Sal): 本课题组前期研究显示,与对照组相比,沙丁醛处理的烧伤小鼠 IL-12、TNF- α 和高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平显著降低,且小鼠存活率显著提高,表明沙丁醛可显著改善烧伤小鼠炎症反应并明显降低其死亡率。烧伤小鼠经沙丁醛处理后可降低 ERS 总量,同时 GRP78 表达和 XBP-1 激活下调,提示沙丁醛具有细胞保护作用且与 DC 细胞中 ERS 的降低相关。此外进一步证实,经沙丁醛处理后,热损伤诱导的脾脏 DC 细胞凋亡率明显降低,其 DC 细胞的 ERS 相关的凋亡信号通路中两个重要因子 CHOP 和活化 caspase-12 的表达水平均下降,而 DC 细胞的成熟和活化增加以及 T 细胞增殖和向 Th1 免疫极化的能力增强,提示用沙丁醛治疗可能调节 ERS 及随后由热损伤引起的脾脏 DC 细胞功能障碍,致使 DC 细胞向免疫刺激反应的表型成熟,从而保护小鼠免受严重烧伤影响^[15]。

5 展望

众所周知, DC 细胞的异质性决定了不同部位 DC 细胞在伤后表现为不同的变化特征,而目前的研究手段多采用小鼠脾脏 DC 细胞或人 PBMCs 分离的 DC 细胞,检测结果只能反映 DC 细胞功能的某一侧面。如何全面、动态、客观地反映机体伤后 DC 细胞的免疫应答水平是未来的发展方向。有研究表明, DC 细胞还参与介导机体抗感染的耐受调节机制^[20],后者通过减少宿主因感染所致的病理学紊乱来维持机体的稳态,是一种有别于免疫应答驱动的抗感染机制,但创伤后机体的感染耐受能力是否发生改变尚未可知。因此,深入探讨创伤/烧伤后 DC 细胞抗感染应答的分子机制对于研发新型调节策略无疑具有重要的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kawasaki T, Fujimi S, Lederer JA, et al. Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice [J].

- J Immunol, 2006, 177 (7): 4514-4520. DOI: 10.4049/jimmunol.177.7.4514.
- [2] Geiger EV, Maier M, Schiessling S, et al. Subsequent gene expression pattern in dendritic cells following multiple trauma [J]. Langenbecks Arch Surg, 2013, 398 (2): 327-333. DOI: 10.1007/s00423-012-1031-8.
- [3] Bohannon J, Cui W, Sherwood E, et al. Dendritic cell modification of neutrophil responses to infection after burn injury [J]. J Immunol, 2010, 185 (5): 2847-2853. DOI: 10.4049/jimmunol.0903619.
- [4] Kawasaki T, Choudhry MA, Suzuki T, et al. 17 β -Estradiol's salutary effects on splenic dendritic cell functions following trauma-hemorrhage are mediated via estrogen receptor- α [J]. Mol Immunol, 2008, 45 (2): 376-385. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.06.148.
- [5] Zhu XM, Dong N, Wang YB, et al. The involvement of endoplasmic reticulum stress response in immune dysfunction of dendritic cells after severe thermal injury in mice [J]. Oncotarget, 2017, 8 (6): 9035-9052. DOI: 10.18632/oncotarget.14764.
- [6] 郭靖, 王震平, 梁华平, 等. 失血合并闭合性骨折致小鼠脾脏树突状细胞抗原递呈功能下降 [J]. 创伤外科杂志, 2007, 9 (3): 252-256. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4237.2007.03.018.
- Guo J, Wang ZP, Liang HP, et al. Effects of hemorrhage plus closed fracture on antigen-presenting capacity of splenic dendritic cells in mice [J]. J Trauma Surg, 2007, 9 (3): 252-256. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4237.2007.03.018.
- [7] Qiu H, Dong SL, Tu YJ, et al. Reduced capacity of dendritic cells from trauma-hemorrhage mice in initiating delayed-type hypersensitivity to fluorescein isothiocyanate [J]. Chin J Traumatol, 2009, 12 (6): 334-338. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2009.06.003.
- [8] Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, et al. Effect of interleukin-15 on depressed splenic dendritic cell functions following trauma-hemorrhage [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296 (1): C124-130. DOI: 10.1152/ajpcell.00447.2008.
- [9] Henrich D, Maier M, Relja B, et al. Significant decline of peripheral myeloid dendritic cells following multiple trauma [J]. J Surg Res, 2009, 154 (2): 239-245. DOI: 10.1016/j.jss.2008.06.038.
- [10] Williams KN, Szilagyi A, He LK, et al. Dendritic cell depletion in burn patients is regulated by MafB expression [J]. J Burn Care Res, 2012, 33 (6): 747-758. DOI: 10.1097/BCR.0b013e318250457f.
- [11] 谢玉刚, 姚彬, 孙伟. 树突状细胞在多发伤中的变化及临床意义 [J]. 中国急救医学, 2005, 25 (11): 804-806. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2005.11.010.
- Xie YG, Yao B, Sun W. Change and clinical significance of DC in the multiple traumas [J]. Chin J Crit Care Med, 2005, 25 (11): 804-806. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2005.11.010.
- [12] Maier M, Geiger EV, Henrich D, et al. Apoptosis differs in dendritic cell subsets early after severe trauma [J]. Hum Immunol, 2009, 70 (10): 803-808. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.07.007.
- [13] Maier M, Wutzler S, Bauer M, et al. Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury [J]. Shock, 2008, 30 (4): 344-351. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181673eb4.
- [14] Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, et al. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294 (3): C754-764. DOI: 10.1152/ajpcell.00494.2007.
- [15] Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Immune modulation by ER stress and inflammation in the tumor microenvironment [J]. Cancer Lett, 2016, 380 (1): 227-236. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.09.009.
- [16] Zhu XM, Yao FH, Yao YM, et al. Endoplasmic reticulum stress and its regulator XBP-1 contributes to dendritic cell maturation and activation induced by high mobility group box-1 protein [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44 (7): 1097-1105. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.03.018.
- [17] Gutiérrez L, Nikolic T, van Dijk TB, et al. Gata1 regulates dendritic-cell development and survival [J]. Blood, 2007, 110 (6): 1933-1941. DOI: 10.1182/blood-2006-09-048322.
- [18] Howell K, Poslusny J, He LK, et al. High MafB expression following burn augments monocyte commitment and inhibits DC differentiation in hemopoietic progenitors [J]. J Leukoc Biol, 2012, 91 (1): 69-81. DOI: 10.1189/jlb.0711338.
- [19] Zhang Y, Zhang J, Xu T, et al. Allicin ameliorates intraintestinal bacterial translocation after trauma/hemorrhagic shock in rats: the role of mesenteric lymph node dendritic cell [J]. Surgery, 2017, 161 (2): 546-555. DOI: 10.1016/j.surg.2016.08.029.
- [20] Bessedé A, Gargaro M, Pallotta MT, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway [J]. Nature, 2014, 511 (7508): 184-190. DOI: 10.1038/nature13323.