

轴突导向因子 3A 对脂多糖诱导的 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞稳定性的影响

高玉雷¹ 李鑫鑫² 刘艳存¹ 李文杰¹ 王紫怡¹ 寿松涛¹ 柴艳芬¹

¹天津医科大学总医院急诊医学科,天津 300052; ²天津医科大学总医院内分泌代谢科,天津 300052

通信作者:柴艳芬, Email: chaiyanfen2012@126.com

【摘要】 目的 探讨轴突导向因子 3A (Sema3A) 对脂多糖 (LPS) 诱导的 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Tregs) 稳定性的作用及机制。**方法** 采用体外免疫磁珠法分离和培养 C57BL/6J 小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺ Tregs, 将分离的细胞按随机数字表法分为对照组 (仅给予抗小鼠 CD3e 和 CD28 诱导细胞处于激活状态)、LPS 组 (在对照组的基础上给予 LPS 100 μg/L)、LPS+ 核转录因子-κB (NF-κB) 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (PDTC) 组 (给予 LPS 100 μg/L+PDTC 25 mg/L)、LPS+ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 组 (给予 LPS 100 μg/L+PBS 10 μL)、LPS+PDTC+ 重组 Sema3A (rSema3A) 组 (给予 LPS 100 μg/L+PDTC 25 mg/L+rSema3A 300 μg/L) 和 LPS+PBS+rSema3A 组 (给予 LPS 100 μg/L+PBS 10 μL+rSema3A 300 μg/L)。各组培养 24 h 后, 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和免疫荧光法检测 CD4⁺CD25⁺ Tregs 特异性标志物叉头翼状转录因子-3 (Foxp-3)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4) 和膜相关转化型生长因子-β1 (TGF-β1^{mt}) 的基因及蛋白表达, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞上清液中白细胞介素-10 (IL-10) 和分泌型转化生长因子-β1 (sTGF-β1) 的水平, 采用免疫荧光法检测细胞凋亡, 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测 Foxp-3-Tregs 特异性去甲基化区 (Foxp-3-TSDR) 的去甲基化程度, 以反映 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的稳定性, 采用电泳迁移率分析 (EMSA) 检测 NF-κB 信号通路的 DNA 结合活性, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 NF-κB 信号通路活性。**结果** 与对照组比较, LPS 能够增加细胞稳定性, 表现为 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF-β1^{mt} 的基因及蛋白表达上调, IL-10 和 sTGF-β1 分泌增加, 细胞凋亡减少, Foxp-3-TSDR 去甲基化程度增加; 同时 LPS 可增加细胞内 NF-κB 信号通路的 DNA 结合活性, 以及主要分子 NF-κB 抑制蛋白激酶 β (IKK β) 和 p65 的磷酸化水平, 说明 LPS 增加细胞稳定性的机制与 NF-κB 信号通路有关。与 LPS 组比较, PBS 并未对细胞稳定性和 NF-κB 信号通路产生影响; 但添加 rSema3A 后能进一步增加细胞稳定性, 并激活 NF-κB 信号通路。而 PDTC 能够抑制 rSema3A 增加细胞稳定性的功能, 表现为: 与 LPS+PBS+rSema3A 组比较, LPS+PDTC+rSema3A 组 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF-β1^{mt} 的基因及蛋白表达明显下调 [Foxp-3 基因 (2^{-ΔΔCt}): 8.092±1.117 比 18.509±1.068, Foxp-3 蛋白 (相对荧光强度): 1.224±0.033 比 1.826±0.181; CTLA-4 基因 (2^{-ΔΔCt}): 3.254±0.760 比 11.840±0.827, CTLA-4 蛋白 (相对荧光强度): 1.305±0.058 比 1.842±0.111; TGF-β1^{mt} 基因 (2^{-ΔΔCt}): 3.589±1.180 比 8.509±0.472, TGF-β1^{mt} 蛋白 (相对荧光强度): 1.319±0.033 比 1.822±0.063, 均 P<0.01], IL-10 和 sTGF-β1 分泌减少 [IL-10 (ng/L): 445.33±54.08 比 992.67±83.10, sTGF-β1 (ng/L): 1116.67±65.25 比 1494.67±94.45, 均 P<0.01], 细胞凋亡明显增加 (荧光强度: 0.398±0.031 比 0.268±0.046, P<0.01), Foxp-3-TSDR 去甲基化程度明显降低 (灰度值: 0.467±0.048 比 1.780±0.119, P<0.01), NF-κB 信号通路的 DNA 结合活性被明显抑制 (灰度值: 1.23±0.02 比 3.95±0.06, P<0.01), IKK β 和 p65 的磷酸化水平降低 [p-IKK β 表达 (p-IKK β /IKK β): 0.97±0.07 比 1.97±0.04, p-p65 (p-p65/p65): 0.95±0.08 比 1.93±0.06, 均 P<0.01]。**结论** LPS 能通过 NF-κB 信号通路增加 CD4⁺CD25⁺ Tregs 稳定性; Sema3A 能够进一步增加 CD4⁺CD25⁺ Tregs 稳定性, 并且与 NF-κB 信号通路有关。

【关键词】 脓毒症; 调节性 T 细胞; 细胞稳定性; 轴突导向因子-3A; 核转录因子-κB

基金项目: 国家自然科学基金 (81701931, 81871593); 天津市自然科学基金青年基金 (18JCQNJC10500)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200706-00501

Effect of semaphorin-3A on the cellular stability of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by lipopolysaccharide

Gao Yulei¹, Li Liuxin², Liu Yancun¹, Li Wenjie¹, Wang Ziyi¹, Shou Songtao¹, Chai Yanfen¹

¹Department of Emergency Medicine, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Chai Yanfen, Email: chaiyanfen2012@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of semaphorin-3A (Sema3A) in maintaining the cellular stability of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** *In vitro*, using immunomagnetic beads, splenic CD4⁺CD25⁺ Tregs of C57BL/6J mice were isolated and cultured. According to the random number table, the isolated cells were divided into control group (treated with anti-CD3e and anti-CD28 for polyclonal activation), LPS group (on the basis of control group, treated with LPS at the dose of 100 μg/L), LPS + nuclear

factor kappa B (NF- κ B) inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group (treated with LPS at the dose of 100 μ g/L and PDTC at the dose of 25 mg/L), LPS + phosphate buffer solution (PBS) group (treated with LPS at the dose of 100 μ g/L and PBS at the volume of 10 μ L), LPS + PDTC + recombinant Sema3A (rSema3A) group (treated with LPS at the dose of 100 μ g/L, PDTC at the dose of 25 mg/L and rSema3A at the dose of 300 μ g/L), and LPS + PBS + rSema3A group (treated with LPS at the dose of 100 μ g/L, PBS at the volume of 10 μ L and rSema3A at the dose of 300 μ g/L). mRNA and protein expressions of the specific markers of CD4⁺CD25⁺ Tregs, including forkhead box protein P-3 (Foxp-3), cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) and membrane-associated transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1^{m+}) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence methods after 24 hours. The supernatant interleukin-10 (IL-10) and secretory type TGF- β 1 (sTGF- β 1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The apoptotic level was detected by immunofluorescence. The demethylation of Foxp3-Tregs-specific demethylated region (Foxp-3-TSDR) was detected by methylation specific PCR (MSP) in order to reflect the cellular stability of CD4⁺CD25⁺ Tregs. DNA binding activity of NF- κ B signaling pathway was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and activity of NF- κ B signaling pathway was determined by Western blotting. **Results** Compared with control group, LPS could increase the cellular stability, including an increase in the mRNA and protein expressions of Foxp-3, CTLA-4 and TGF- β 1^{m+} and secretion of IL-10 and sTGF- β 1, decrease in the level of apoptosis and increase in the methylation of Foxp-3-TSDR. At the same time, LPS increased DNA binding activity of NF- κ B signaling pathway and phosphorylation levels of the major molecules of NF- κ B, including inhibitory protein kinase β (IKK β) and p65, suggesting that the mechanism of enhancing cellular stability by LPS was related to the NF- κ B signaling pathway. Compared with LPS group, PBS had no effect on cellular stability and NF- κ B signaling pathway. However, administration of rSema3A further promoted cellular stability and activated NF- κ B signaling pathway. Compared with LPS + PBS + rSema3A group, PDTC inhibited the function of rSema3A to increase cellular stability, as the mRNA and protein expressions of Foxp-3, CTLA-4 and TGF- β 1^{m+} were significantly down-regulated in the LPS + PDTC + rSema3A group [Foxp-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.092 \pm 1.117 vs. 18.509 \pm 1.068, Foxp-3 protein (relative fluorescence intensity): 1.224 \pm 0.033 vs. 1.826 \pm 0.181; CTLA-4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.254 \pm 0.760 vs. 11.840 \pm 0.827, CTLA-4 protein (relative fluorescence intensity): 1.305 \pm 0.058 vs. 1.842 \pm 0.111; TGF- β 1^{m+} mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.589 \pm 1.180 vs. 8.509 \pm 0.472, TGF- β 1^{m+} protein (relative fluorescence intensity): 1.319 \pm 0.033 vs. 1.822 \pm 0.063, all $P < 0.01$], the secretion of IL-10 and sTGF- β 1 were significantly decreased [IL-10 (ng/L): 445.33 \pm 54.08 vs. 992.67 \pm 83.10, sTGF- β 1 (ng/L): 1 116.67 \pm 65.25 vs. 1 494.67 \pm 94.45, both $P < 0.01$], the apoptosis was significantly increased (fluorescence intensity: 0.398 \pm 0.031 vs. 0.268 \pm 0.046, $P < 0.01$), the methylation of Foxp-3-TSDR was significantly decreased (grey value: 0.467 \pm 0.048 vs. 1.780 \pm 0.119, $P < 0.01$), the DNA binding activity of NF- κ B signaling pathway was significantly inhibited (grey value: 1.23 \pm 0.02 vs. 3.95 \pm 0.06, $P < 0.01$), and the phosphorylation levels of IKK β and p65 were significantly decreased [p-IKK β (p-IKK β /IKK β): 0.97 \pm 0.07 vs. 1.97 \pm 0.04, p-p65 (p-p65/p65): 0.95 \pm 0.08 vs. 1.93 \pm 0.06, both $P < 0.01$]. **Conclusion** LPS increases the cellular stability of CD4⁺CD25⁺ Tregs through the NF- κ B signaling pathway, and Sema3A further increases the cellular stability of CD4⁺CD25⁺ Tregs, and is related to the NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Sepsis; Regulatory T cells; Cellular stability; Semaphorin-3A; Nuclear factor- κ B

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81701931, 81871593); National Natural Science Foundation of Tianjin (18JCQNJC10500)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200706-00501

随着对脓毒症病理生理学认识的逐渐深入,脓毒症被定义为宿主对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。脓毒症具有高发病率、高病死率、高额医疗费用和存活者长期遗留后遗症等特点。我国重症监护病房(ICU)内约有 20% 的患者会发生脓毒症,且 90 d 病死率为 35.5%^[2]。大量实验和临床证据表明,免疫抑制是脓症患者病情加重、合并多器官功能障碍综合征(MODS)甚至死亡的根源^[3-4]。调节性 T 细胞(Tregs)是具有负向免疫调控功能的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群细胞,可特征性表达白细胞介素-2(IL-2)受体(CD25)和叉头翼状转录因子-3(Foxp-3)^[5]。脓毒症幸存者往往长期处于免疫抑制状态,且易继发二次感染,脓毒症或脓毒性休克容易引起外周循环 Tregs 比例增加及稳定性增强,并且这与脓毒症诱导的免疫抑制密切相

关^[6-7]。然而,在脓毒症中,Tregs 维持自身稳定性并参与脓毒症诱导免疫抑制的具体病理生理学机制目前尚不清楚。轴突导向因子 3A(Sema3A)是 Sema 家族成员之一,是神经纤毛蛋白-1(Nrp-1)的特异性配体^[8]。Nrp-1 特异性表达于 CD4⁺CD25⁺Tregs 表面,不仅参与 Tregs 在胸腺内的发育,而且在维持外周循环 Tregs 稳定性和负向免疫调控功能方面发挥着至关重要的作用^[9-10]。研究表明,使用脂多糖(LPS)诱导急性肾损伤(AKI),能够使外周循环、肾小管上皮细胞以及尿液中 Sema3A 水平明显升高^[11]。基于此,我们推测 Sema3A 在维持脓毒症时 Tregs 稳定性方面发挥着重要作用,并采用 LPS 模拟体外脓毒症环境,探讨 Sema3A 对 Tregs 的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与伦理学: 选择近交系封闭群雄性

C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体重(20 ± 2)g, 购自中国医学科学院实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(京)2014-0004。实验流程均按国家实验室动物使用指南在 SPF 级实验室进行, 本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并得到天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会的批准(审批号: IRB2020-DW-10)。

1.2 主要试剂与仪器: 小鼠 $CD4^+CD25^+$ Tregs 分离试剂盒购自德国美天旎生物技术有限公司; LPS、吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)、重组 Sema3A(rSema3A)、M-mLV 反转录酶均购自美国 Invitrogen 公司; 抗小鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制蛋白激酶 β (IKK β)及其磷酸化(p-IKK β)、p65 及其磷酸化(p-p65)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、荧光素标记的荧光二抗、Rhoda mine 标记的荧光二抗、抗小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)/Foxp-3/膜相关转化型生长因子- β 1(TGF- β 1^{m+})、CD3e 和 CD28 均购自美国 Abcam 公司; DNA 甲基化试剂盒购自广州信佰生物科技公司; 原位末端缺刻标记法(TUNEL)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 Raybio 公司。MiniMACS™ 细胞分选仪购自德国美天旎生物技术有限公司, 免疫荧光显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, 实时聚合酶链反应(PCR)扩增仪购自美国 Bio-rad 公司, DYCP-31BM 型水平电泳装置购自北京市六一仪器厂, LabWorks™ 凝胶成像及分析系统购自美国 UVP 公司。

1.3 小鼠脾脏 $CD4^+CD25^+$ Tregs 的分离: 采用免疫磁珠法。颈部脱臼处死小鼠后无菌分离脾脏, 使用 200 目钢丝滤网充分研磨制备脾脏细胞悬液, 采用 Ficoll-Paque 离心液初步分离单核细胞, 并用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞, 进行细胞计数。按照试剂盒说明书要求分离 $CD4^+CD25^+$ Tregs, 并使用锥虫蓝检测细胞活性达到 96% 以上时接种到 96 孔培养板。

1.4 实验分组与处理: 将分离后的 $CD4^+CD25^+$ Tregs 分为 6 组, 每组设置 4 个重复孔。对照组仅给予抗小鼠 CD3e(5 mg/L)和抗小鼠 CD28(2 mg/L)分子刺激, 诱导细胞为激活状态; LPS 组在对照组基础上给予 LPS(100 μ g/L)诱导, 模拟脓毒症环境; LPS+PDTC 组在 LPS 组基础上给予溶解于 PBS 中的 NF- κ B 抑制剂 PDTC(25 mg/L)干预; LPS+PBS 组在 LPS 组基础上给予 10 μ L 溶解 PDTC 的 PBS 干预, 排除 PBS 或培养液稀释等造成的干扰; LPS+PDTC+rSema3A 组在

LPS 和 PDTC 干预基础上, 给予 rSema3A(300 μ g/L)干预; LPS+PBS+rSema3A 组在 LPS 和 PBS 干预基础上, 给予 rSema3A(300 μ g/L)干预。各组培养 24 h 后检测 $CD4^+CD25^+$ Tregs 稳定性和 NF- κ B 信号通路活性。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞特异性标志物 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1 的基因表达: 提取各组细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 使用 SYBR 荧光定量试剂盒, 按照实时定量 PCR 方法检测 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1 的基因表达水平。引物序列由美国 Thermo Fisher 生物公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达定量。

1.5.2 免疫荧光法检测细胞特异性标志物水平与凋亡: 使用 PBS 将各组 $CD4^+CD25^+$ Tregs 重悬并计数, 固定于载玻片上, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 随后加入兔抗小鼠 CTLA-4、Foxp-3 和 TGF- β 1^{m+} 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。在 4 $^{\circ}$ C 下用异硫氰酸荧光素/别藻青蛋白(FITC/APC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)孵育 30 min。使用免疫荧光显微镜在发射波长为 525 nm(绿色荧光)的条件下进行分析, 并采用 Image J 软件进行数据采集和处理, 计算各组细胞荧光强度。按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书要求, 检测各组 $CD4^+CD25^+$ Tregs 的凋亡水平。

1.5.3 ELISA 检测细胞分泌的抑制性细胞因子 IL-10 和分泌型转化生长因子- β 1(sTGF- β 1)水平: 按照 ELISA 试剂盒说明书要求, 检测细胞上清液中 IL-10 和 sTGF- β 1 的分泌水平。通过多功能酶标仪在 450 nm 波长处读取吸光度(A)值。依据标准品 A 值绘制样本含量标准曲线, 计算样本水平。

1.5.4 甲基化特异性 PCR(MSP)检测 Foxp-3-Tregs 特异性去甲基化区(Foxp-3-TSDR)的去甲基化程度: 将细胞按 DNA 甲基化试剂盒说明书要求进行亚硫酸氢钠法甲基化修饰。根据 DNA 甲基化芯片结果进行 MSP 验证。使用 Methyl Primer Express 1.0 软件设计甲基化和非甲基化上、下游引物(引物序列、目的片段大小), 引物由上海康成生物技术有限公司合成。简单步骤: ① 抽提基因组 DNA, 并定量; ② 使用亚硫酸氢钠处理各组 DNA(pH 值 5.0、50 $^{\circ}$ C、8~16 h, 所有试剂新鲜配制); ③ DNA 修饰后纯化回收; ④ 行 PCR 检测; ⑤ 行琼脂糖凝胶电泳; ⑥ 使用 Image J 软件采集条带的灰度值以反映 Foxp-3-TSDR 的去甲基化程度。

1.5.5 电泳迁移率实验(EMSA)检测 NF- κ B 信号通

路的 DNA 结合活性:使用生物素标记的 DNA 寡核苷酸探针(正向:5-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-生物素;反向:5-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-生物素-3)检测 NF- κ B 信号通路的 DNA 结合活性,并设置生物素-自由探针作为对照。采用 Image J 软件分析条带的灰度值,计算各组靶向探针与自由探针条带灰度值的比值。

1.5.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 IKK β 和 p65 的磷酸化水平:使用细胞裂解液处理各组 CD4⁺CD25⁺Tregs,并提取总蛋白进行蛋白定量检测。使用蛋白电泳仪转膜后,室温下使用牛血清白蛋白(BSA)封膜 2 h,之后按照 1:1000 给予一抗孵育过夜。使用辣根过氧化物酶(HRP)室温下孵育 2 h,用 Lab Works™ 成像分析系统进行图像处理与分析。采用 Image J 软件采集总 IKK β 、p65 和 p-IKK β 、p-p65 条带的灰度值,以 p-IKK β /IKK β 和 p-p65/p65 的灰度值比值代表 IKK β 、p65 的磷酸化水平。

1.6 统计学分析:所有实验结果均重复 4 次,取平均值。使用 SPSS 24.0 统计软件分析数据,计量资料符合正态分布以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据之间比较采用单因素方差分析,并采用 SNK- q 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rSema3A 对 LPS 诱导下 CD4⁺CD25⁺Tregs 特异性标志物 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 表达的影响(表 1):LPS 能够在基因和蛋白水平促进 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 的表达,特别是在基因水平,LPS 组 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 的表达均明显高于对照组($P < 0.01$)。与 LPS 组比较,PBS 并未对上述标志物表达产生影响,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);给予 rSema3A 干预能够进一步促进 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 的基因和蛋白表达水平,与 LPS 组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

与 LPS 组和 LPS+PBS+rSema3A 组比较,使用 PDTC 抑制细胞内 NF- κ B 信号通路活性,能够抑制 LPS 以及 LPS 联合 rSema3A 对 CD4⁺CD25⁺Tregs 的作用,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.2 rSema3A 对 LPS 诱导下 CD4⁺CD25⁺Tregs 分泌 IL-10 和 sTGF- β 1 能力的影响(表 2):与对照组比较,LPS 能够促进细胞分泌 IL-10 和 sTGF- β 1,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与 LPS 组比较,PBS 并未对细胞分泌抑制性细胞因子产生影响,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);进一步给予 rSema3A 干预,仅能促进 IL-10 分泌($P < 0.01$),而并未影响 sTGF- β 1 分泌($P > 0.05$)。与 LPS 组和 LPS+PBS+rSema3A 组比较,PDTC 能够明显抑制 LPS 和 rSema3A 对细胞因子分泌的影响(均 $P < 0.01$)。

表 2 各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 分泌细胞因子、凋亡和 Foxp-3-TSDR 去甲基化程度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	IL-10 (ng/L)	sTGF- β 1 (ng/L)
对照组	4	503.67 \pm 58.59	1 056.67 \pm 27.47
LPS 组	4	757.33 \pm 26.08 ^a	1 504.00 \pm 31.10 ^a
LPS+PDTC 组	4	527.67 \pm 29.02 ^b	1 032.00 \pm 18.52 ^b
LPS+PBS 组	4	717.67 \pm 7.77 ^{ac}	1 491.67 \pm 97.35 ^{ac}
LPS+PDTC+rSema3A 组	4	445.33 \pm 54.08 ^b	1 116.67 \pm 65.25 ^b
LPS+PBS+rSema3A 组	4	992.67 \pm 83.10 ^{abcd}	1 494.67 \pm 94.45 ^{acd}
组别	样本数 (孔)	细胞凋亡 (荧光强度)	Foxp-3-TSDR 去甲基化程度(灰度值)
对照组	4	1.414 \pm 0.088	0.397 \pm 0.280
LPS 组	4	0.422 \pm 0.027 ^a	1.023 \pm 0.035 ^a
LPS+PDTC 组	4	1.464 \pm 0.037 ^b	0.481 \pm 0.048 ^b
LPS+PBS 组	4	0.432 \pm 0.044 ^{ac}	1.004 \pm 0.020 ^{ac}
LPS+PDTC+rSema3A 组	4	0.398 \pm 0.031 ^{ac}	0.467 \pm 0.048 ^b
LPS+PBS+rSema3A 组	4	0.268 \pm 0.046 ^{abcd}	1.780 \pm 0.119 ^{abcd}

注:Tregs 为调节性 T 细胞,Foxp-3-TSDR 为叉头翼状转录因子-3(Foxp-3)-Tregs 特异性去甲基化区,LPS 为脂多糖,PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯,PBS 为磷酸盐缓冲液,rSema3A 为重链轴突导向分子 3A,IL-10 为白细胞介素-10,sTGF- β 1 为分泌型转化生长因子- β 1;与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$;与 LPS+PDTC 组比较,^c $P < 0.01$;与 LPS+PDTC+rSema3A 组比较,^d $P < 0.01$ 。

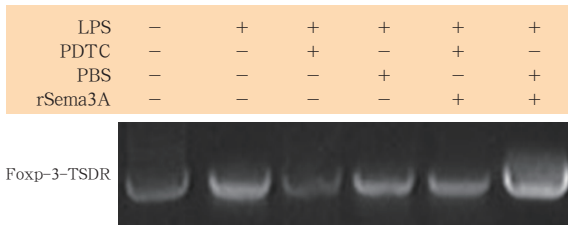
表 1 各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 特征性标志物基因和蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	基因表达(2 ^{-$\Delta\Delta C_t$})			蛋白表达(相对荧光强度)		
		Foxp-3	CTLA-4	TGF- β 1 ^{m+}	Foxp-3	CTLA-4	TGF- β 1 ^{m+}
对照组	4	1.021 \pm 0.253	1.026 \pm 0.271	1.006 \pm 0.131	1.248 \pm 0.044	1.286 \pm 0.101	1.224 \pm 0.044
LPS 组	4	10.943 \pm 1.988 ^a	5.585 \pm 0.483 ^a	5.017 \pm 1.033 ^a	1.405 \pm 0.051 ^b	1.567 \pm 0.104 ^a	1.745 \pm 0.051 ^a
LPS+PDTC 组	4	7.488 \pm 0.805 ^{ac}	1.998 \pm 0.465 ^c	3.038 \pm 0.154 ^{ac}	1.183 \pm 0.056 ^c	1.271 \pm 0.063 ^c	1.268 \pm 0.056 ^c
LPS+PBS 组	4	12.096 \pm 0.649 ^{ac}	6.393 \pm 0.126 ^{ac}	4.926 \pm 0.523 ^{ac}	1.379 \pm 0.059 ^{bc}	1.495 \pm 0.084 ^{ac}	1.744 \pm 0.064 ^{ac}
LPS+PDTC+rSema3A 组	4	8.092 \pm 1.117 ^{ac}	3.254 \pm 0.760 ^{ac}	3.589 \pm 1.180 ^{ad}	1.224 \pm 0.033 ^c	1.305 \pm 0.058 ^c	1.319 \pm 0.033 ^c
LPS+PBS+rSema3A 组	4	18.509 \pm 1.068 ^{cef}	11.840 \pm 0.827 ^{cef}	8.509 \pm 0.472 ^{cef}	1.826 \pm 0.181 ^{cef}	1.842 \pm 0.111 ^{cef}	1.822 \pm 0.063 ^{cef}

注:Tregs 为调节性 T 细胞,LPS 为脂多糖,PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯,PBS 为磷酸盐缓冲液,rSema3A 为重链轴突导向分子 3A,Foxp-3 为叉头翼状转录因子-3,CTLA-4 为细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4,TGF- β 1^{m+} 为膜相关转化生长因子- β 1;与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$;与 LPS+PDTC 组比较,^e $P < 0.01$;与 LPS+PDTC+rSema3A 组比较,^f $P < 0.01$ 。

2.3 rSema3A 对 LPS 诱导下 CD4⁺CD25⁺Tregs 凋亡的影响 (表 2):与对照组比较, LPS 诱导的脓毒症环境能够抑制细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, PBS 并未对细胞凋亡产生影响, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 添加 rSema3A 干预能够进一步抑制细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 LPS 组和 LPS+PBS+rSema3A 组比较, 给予 PDTC 后, 能够促进细胞凋亡, 抑制 LPS 和 rSema3A 的干预作用, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

2.4 rSema3A 对 LPS 诱导下 Foxp-3-TSDR 去甲基化程度的影响 (表 2; 图 1):与对照组比较, LPS 诱导的脓毒症环境能够增加 Foxp-3-TSDR 去甲基化水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, PBS 并未对 Foxp-3-TSDR 去甲基化程度产生影响, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 添加 rSema3A 干预能够进一步提高去甲基化水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 LPS 组和 LPS+PBS+rSema3A 组比较, 给予 PDTC 后, 能够降低去甲基化水平, 抑制 LPS 和 rSema3A 的干预作用, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。



LPS 为脂多糖, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯, PBS 为磷酸盐缓冲液, rSema3A 为重组轴突导向分子 3A, Tregs 为调节性 T 细胞, Foxp-3-TSDR 为叉头翼状转录因子-3 (Foxp-3)-Tregs 特异性去甲基化区

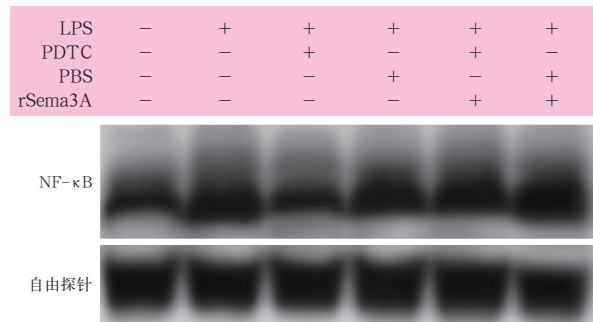
图 1 甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 Foxp-3-TSDR 的去甲基化水平

2.5 rSema3A 对 LPS 诱导下 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 信号通路活性的影响 (表 3; 图 2~3):与对照组比较, LPS 能够增加 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 的 DNA 结合活性及 IKK β 和 p65 的磷酸化水平, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与 LPS 组比较, PBS 并未对 NF-κB 信号通路活性产生影响, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 而给予 rSema3A 干预能够进一步提高 NF-κB 的 DNA 结合活性及 IKK β 和 p65 的磷酸化水平, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与 LPS 组和 LPS+PBS+rSema3A 组比较, 使用 PDTC 能够抑制 LPS 以及 LPS 联合 rSema3A 对 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 信号通路活性的干预作用, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

表 3 各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 信号通路活性水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

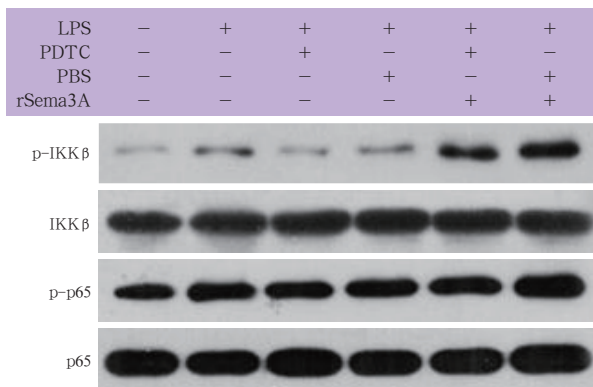
组别	样本数	NF-κB 的 DNA 结合活性 (灰度值)	p-IKK β / IKK β	p-p65 / p65
对照组	4	1.21 ± 0.02	0.96 ± 0.05	0.88 ± 0.05
LPS 组	4	3.49 ± 0.05 ^a	1.52 ± 0.03 ^a	1.60 ± 0.05 ^a
LPS+PDTC 组	4	1.21 ± 0.01 ^b	1.01 ± 0.01 ^b	0.88 ± 0.02 ^b
LPS+PBS 组	4	3.41 ± 0.02 ^{ac}	1.52 ± 0.03 ^{ac}	1.61 ± 0.01 ^{ac}
LPS+PDTC+rSema3A 组	4	1.23 ± 0.02 ^b	0.97 ± 0.07 ^b	0.95 ± 0.08 ^b
LPS+PBS+rSema3A 组	4	3.95 ± 0.06 ^{abcd}	1.97 ± 0.04 ^{abcd}	1.93 ± 0.06 ^{abcd}

注: Tregs 为调节性 T 细胞, NF-κB 为核转录因子-κB, LPS 为脂多糖, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯, PBS 为磷酸盐缓冲液, rSema3A 为重组轴突导向分子 3A, IKK β 为 NF-κB 抑制蛋白激酶 β, p-IKK β 为磷酸化 IKK β, p-p65 为磷酸化 p65; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 LPS+PDTC 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 LPS+PDTC+rSema3A 组比较, ^d $P < 0.01$



LPS 为脂多糖, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯, PBS 为磷酸盐缓冲液, rSema3A 为重组轴突导向分子 3A, NF-κB 为核转录因子-κB, Tregs 为调节性 T 细胞

图 2 电泳迁移率实验 (EMSA) 检测各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 的 DNA 结合活性



LPS 为脂多糖, PDTC 为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯, PBS 为磷酸盐缓冲液, rSema3A 为重组轴突导向分子 3A, IKK β 为核转录因子-κB (NF-κB) 抑制蛋白激酶 β, p-IKK β 为磷酸化 IKK β, p-p65 为磷酸化 p65, Tregs 为调节性 T 细胞, NF-κB 为核转录因子-κB

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 CD4⁺CD25⁺Tregs 内 NF-κB 主要分子 IKK β 和 p65 以及磷酸化表达水平

3 讨论

脓毒症导致免疫抑制的病理生理学机制尚不清晰, 且目前临床上尚无系统、规范的针对免疫调

节治疗的方法^[12]。Tregs 是一类具有负向免疫调控功能的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群细胞,需要终生保持自身的稳定性、可塑性和免疫调节功能,才能抑制致命的自身免疫和过度炎症反应^[5]。特异性标志物 Foxp-3 是 Tregs 维持自身稳定性的关键。Tregs 稳定性具体是指 Tregs 维持外周负向免疫调控功能的能力^[5-7],其外周负向免疫调控功能主要表现在 4 个方面:① 稳定性表达 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 等特异性标志物,并发挥以细胞接触机制为主的免疫调节功能;② 稳定性分泌 IL-10 和 sTGF- β 1 等抑制性细胞因子,并发挥以分泌机制为主的免疫调节功能;③ 延长存活周期,提高抗凋亡能力;④ 对 T 细胞等免疫细胞稳定的免疫抑制功能^[5-7, 13-14]。本研究表明, LPS 模拟脓毒症环境能够增强 Tregs 稳定性,具体表现为增强细胞表达 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+} 等特征性标志物,促进细胞分泌 IL-10 和 sTGF- β 1 等抑制性细胞因子,以及提高细胞抗凋亡能力。这与脓毒症和脓毒性休克时外周循环 Tregs 细胞比例及 Foxp-3 表达增加有关,且与脓毒症诱导的免疫抑制状态相一致^[7]。Nrp-1 主要表达于 CD4⁺CD8⁻ 双阴性细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞和 CD4⁺CD25⁺ Tregs^[15]。一项继发二次铜绿假单胞菌肺部感染脓毒症模型的研究表明, Nrp-1⁺Foxp-3⁺ Tregs 在脓毒症病情发展中发挥关键性作用,且发病早期和晚期的细胞稳定性均显著提高^[16]。Sema3A 是 Nrp-1 的特异性配体之一。LPS 经 Toll 样受体 (TLR) 可诱导 T 细胞表达和分泌 Sema3A,并能够下调 T 细胞的细胞活化水平,即完成自分泌调节过程。在小鼠关节炎模型中, Sema3A 能够提高 CD4⁺Nrp-1⁺ Tregs 抑制 CD4⁺T 细胞的能力^[17]。本研究表明, rSema3A 能够进一步提高 Tregs 的细胞稳定性,特别是能够增加细胞表达特异性标志物 Foxp-3、CTLA-4 和 TGF- β 1^{m+},促进细胞分泌 IL-10,以及提高细胞的抗凋亡能力,然而并未对 sTGF- β 1 的分泌产生显著影响。

Tregs 维持自身稳定性的核心在于 Foxp-3-TSDR 的去甲基化程度,随着该区域去甲基化程度的增加, Tregs 稳定性逐渐增强,这一特点与其他 T 细胞恰恰相反^[18]。Tatura 等^[16]证实,脓毒症时自然性和大部分诱导性 Tregs 表现为 Foxp-3-TSDR 高度去甲基化状态,且与其负向免疫调控功能密切相关。本研究表明,体外 LPS 诱导的脓毒症环境能够增加 Foxp-3-TSDR 去甲基化水平,并且添加 rSema3A 干

预能够进一步增加 Foxp-3-TSDR 去甲基化程度。既往研究已证实, NF- κ B 信号通路及其主要转录因子,特别是经 IKK β 、c-Rel 和 p65 (RelA) 控制的经典信号通路,在 Tregs 胸腺内分化、维持自身外周稳定性及发挥稳定的负性免疫调控功能等生物学功能中占有关键性地位^[19-21]。尽管 NF- κ B 信号通路能够调控 Foxp-3 等 Tregs 主要功能标志物的表达,并且作为主要反应原件参与 Foxp-3-TSDR 去甲基化过程,但少有关于 NF- κ B 信号通路参与脓毒症时 Tregs 维持自身外周稳定性的研究^[22]。特异性敲除 p65 的 Tregs 失去了维持外周细胞稳定性的能力^[20]。特异性敲除 IKK β 能够诱发自身免疫综合征,这与 Tregs 存活周期缩短等有关^[21]。本研究表明,脓毒症时 NF- κ B 信号通路参与了 Tregs 维持自身外周细胞稳定性的过程, LPS 模拟脓毒症环境能够增强 NF- κ B 信号通路的 DNA 结合活性,增加 IKK β 和 p65 的磷酸化水平;给予 NF- κ B 信号通路抑制剂 PDTC 能够显著抑制 LPS 诱导的 Tregs 稳定性,其特征性标志物、主要抑制性细胞因子以及 Foxp-3-TSDR 去甲基化程度降低,并且细胞凋亡水平增加。脓毒症时,外周循环以及主要器官内 Sema3A 水平升高^[11, 23]。本研究中使用 LPS 模拟脓毒症环境,给予 rSema3A 干预后,能够进一步增强 NF- κ B 信号通路的 DNA 结合活性,增加 IKK β 和 p65 的磷酸化水平;而给予 PDTC 干预,能够有效抑制 rSema3A 增强 Tregs 稳定性的功能,这表明 NF- κ B 信号通路参与了脓毒症时 Sema3A 维持 Tregs 稳定性的过程。

综上所述,本研究表明, Sema3A 参与了脓毒症时维持外周 Tregs 稳定性的过程,其机制与 NF- κ B 信号通路有关。免疫抑制,特别是 Tregs 稳定性增强引起的负向免疫调控作用,是脓毒症发生发展的关键机制,与脓毒症患者死亡密切相关; Sema3A 在脓毒症中水平升高,且与器官损伤甚至死亡密切相关,有望成为脓毒症免疫调控治疗的靶点之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Raith EP, Udy AA, Bailey M, et al. Prognostic accuracy of the SOFA score, SIRS criteria, and qSOFA score for in-hospital mortality among adults with suspected infection admitted to the intensive care unit [J]. JAMA, 2017, 317 (3): 290-300. DOI: 10.1001/jama.2016.20328.
- [2] Xie JF, Wang HL, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48 (3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [3] Stolk RF, Kox M, Pickkers P. Noradrenaline drives immunosuppression in sepsis: clinical consequences [J]. Intensive

- Care Med, 2020, 46 (6): 1246–1248. DOI: 10.1007/s00134-020-06025-2.
- [4] 高经华, 刘喆滢, 刘志峰. 共抑制分子在脓毒症免疫功能障碍中作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (1): 121–125. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190916-00023.
- Gao JH, Liu ZY, Liu ZF. Study progress of role of co-suppressor molecules in sepsis immune dysfunction [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (1): 121–125. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190916-00023.
- [5] Hori S. Stability of regulatory T-cell lineage [J]. Adv Immunol, 2011, 112: 1–24. DOI: 10.1016/B978-0-12-387827-4.00001-2.
- [6] Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14919. DOI: 10.1038/ncomms14919.
- [7] Cao C, Yin C, Chai Y, et al. Ulinastatin mediates suppression of regulatory T cells through TLR4/NF- κ B signaling pathway in murine sepsis [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 64: 411–423. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.09.025.
- [8] Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, et al. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling [J]. J Neurosci, 2006, 26 (11): 2971–2980. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5453-05.2006.
- [9] Delgoffe GM, Woo SR, Turnis ME, et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis [J]. Nature, 2013, 501 (7466): 252–256. DOI: 10.1038/nature12428.
- [10] 高玉雷, 姚咏明, 柴艳芬, 等. 神经纤毛蛋白-1 与膜相关转化生长因子- β 共表达调节 T 细胞免疫抑制功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (4): 205–209. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.04.006.
- Gao YL, Yao YM, Chai YF, et al. Neuropilin-1 is a co-expression receptor for membrane associated transforming growth factor- β contributing to the immunosuppressive property of regulatory T cells [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2013, 20 (4): 205–209. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.04.006.
- [11] Tian X, Gan H, Zeng Y, et al. Inhibition of semaphorin-3a suppresses lipopolysaccharide-induced acute kidney injury [J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96 (7): 713–724. DOI: 10.1007/s00109-018-1653-6.
- [12] 董丽华, 吕娟, 丁黎莉, 等. 脓毒症免疫治疗的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (2): 184–187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.019.
- Dong LH, Lyu J, Ding LL, et al. Advances in immunotherapeutic research of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (2): 184–187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.019.
- [13] Rubtsov YP, Neeb RE, Josefowicz S, et al. Stability of the regulatory T cell lineage *in vivo* [J]. Science, 2010, 329 (5999): 1667–1671. DOI: 10.1126/science.1191996.
- [14] Knosp CA, Schiering C, Spence S, et al. Regulation of Foxp3⁺ inducible regulatory T cell stability by SOCS2 [J]. J Immunol, 2013, 190 (7): 3235–3245. DOI: 10.4049/jimmunol.1201396.
- [15] Corbel C, Lemarchandel V, Thomas-Vaslin V, et al. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation [J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31 (11): 1082–1094. DOI: 10.1016/j.dci.2007.01.009.
- [16] Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W, et al. Relevance of Foxp3⁺ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis [J]. Immunology, 2015, 146 (1): 144–156. DOI: 10.1111/imm.12490.
- [17] Catalano A. The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis [J]. J Immunol, 2010, 185 (10): 6373–6383. DOI: 10.4049/jimmunol.0903527.
- [18] Karl M, Sommer C, Gabriel CH, et al. Recruitment of histone methyltransferase Ehm1 to Foxp3 TSDR counteracts differentiation of induced regulatory T cells [J]. J Mol Biol, 2019, 431 (19): 3606–3625. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.07.031.
- [19] Grinberg-Bleyer Y, Caron R, Seeley JJ, et al. The alternative NF- κ B pathway in regulatory T cell homeostasis and suppressive function [J]. J Immunol, 2018, 200 (7): 2362–2371. DOI: 10.4049/jimmunol.1800042.
- [20] Ronin E, Lubrano di Ricco M, Vallion R, et al. The NF- κ B RelA transcription factor is critical for regulatory T cell activation and stability [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2487. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02487.
- [21] Heuser C, Gotot J, Piotrowski EC, et al. Prolonged IKK β inhibition improves ongoing CTL antitumor responses by incapacitating regulatory T cells [J]. Cell Rep, 2017, 21 (3): 578–586. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.082.
- [22] 孙立新, 彭凡岭, 纪前. Toll 样受体 4 通路在重症急性胰腺炎小鼠肺损伤中的作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36 (6): 1055–1057. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2019.06.023.
- Sun LX, Peng FL, Ji Q. The mechanism of Toll-like receptor 4 pathway in lung injury induced by severe acute pancreatitis in mice [J]. Chin J Exp Surg, 2019, 36 (6): 1055–1057. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2019.06.023.
- [23] 田漫漫, 赵双平. 尿 Sema3A 对重症监护病房患者急性肾损伤的早期诊断价值 [J]. 中华医学杂志, 2015, 95 (19): 1457–1462. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.19.005.
- Tian MM, Zhao SP. The early diagnostic value of urinary Sema3A for ICU adult patients with acute kidney injury [J]. Natl Med J Chin, 2015, 95 (19): 1457–1462. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.19.005.

(收稿日期: 2020-07-06)

• 科研新闻速递 •

严重皮肤和软组织感染重度肥胖患者的利奈唑胺药代动力学评估

利奈唑胺的成人标准剂量为 600 mg、每 12 h 1 次。有文献报道, 重度肥胖患者需要更高的给药剂量。为此, 有学者进行了相关研究, 旨在评估严重皮肤和软组织感染 (SSTI) 重度肥胖患者的利奈唑胺血药浓度是否达标。严重 SSTI 的定义为坏死性筋膜炎、肌坏死或合并脓毒症的 SSTI。受试对象为体重指数 (BMI) ≥ 30 kg/m² 且于 2018 年 8 月至 2019 年 4 月接受静脉注射利奈唑胺治疗的严重 SSTI 成年患者。在输注利奈唑胺后 1、3、5 h 采集血液样本。血药浓度达标定义为 24 h 内稳态血药浓度时间的受试者工作特征曲线下面积 (AUC_{0~24h}) / 最低抑菌浓度 (MIC) ≥ 100 h · mg · L⁻¹。研究人员利用蒙特卡罗模拟的方法来计算目标获得概率 (PTA)。结果显示, 11 例患者被纳入研究。患者的中位 BMI 为 45.7 kg/m², 中位体重为 136.0 kg。7 例患者接受了标准剂量的利奈唑胺治疗, 4 例患者接受了剂量为 600 mg、每 8 h 1 次的治疗。对于体重为 140 kg 的非肝硬化患者, 标准利奈唑胺剂量下 MIC 为 0.5、1、2、4 mg/L 时的 PTA 分别为 100.0%、98.8%、34.1% 和 0%。研究人员据此得出结论: 对于体重 ≥ 140 kg 且 MIC ≥ 2 mg/L 的非肝硬化患者, 标准剂量的利奈唑胺无法达到 PTA $\geq 90\%$ 。这项研究表明, 标准的利奈唑胺剂量可能并不适合所有患者。

罗红敏, 编译自《Antimicrob Agents Chemother》, 2020, AAC.01619-20