

• 论著 •

补体 C5a 通过调节树突细胞功能诱导 Treg/Th17 参与脓毒症的发病过程

齐安龙^{1,2} 王桐³ 柴艳芬¹ 张建宁^{2,4}

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, 天津 300070; ³ 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室(天津医科大学), 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 天津医科大学朱宪彝纪念医院重症医学科, 天津 300170;

⁴ 天津医科大学总医院神经外科, 天津 300052

通信作者: 张建宁, Email: jianningzhang@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨脓毒症发病机制中补体 C5a 参与免疫调节的机制。**方法** 选择 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 按照随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组(CLP 组)和 CLP+抗 C5a 单克隆抗体干预组(CLP+anti-C5a 组), 每组 20 只。构建 CLP 诱发脓毒症模型; Sham 组只开腹不进行结扎穿孔。CLP+anti-C5a 组于制模后立即腹腔注射抗 C5a 单克隆抗体 0.15 mg 干预; Sham 组和 CLP 组给予等量生理盐水。采用 Kaplan-Meier 法对小鼠进行累积生存分析; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测术后 24、48、72 h 外周血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-12、IL-4)及 γ -干扰素(IFN- γ)水平; 采用免疫组化法观察术后 48 h 肺组织及肾组织 C5a 受体(C5aR)表达; 采用流式细胞仪检测术后 48 h 脾脏单个核细胞中树突细胞(DC)、调节性 T 细胞(Treg)和辅助性 T 细胞 17(Th17)的比例。**结果** CLP 组小鼠 7 d 累积生存率较 Sham 组明显下降(30.00% 比 100.00%; Log-Rank 检验: $\chi^2=47.470$, $P<0.001$); 血清炎症因子 TNF- α 、IL-12 及 IL-4 水平于术后 24 h 先反应性升高, 48 h 明显下降, 随后于 72 h 逐渐升高, 而 IFN- γ 水平于术后 24 h 开始持续升高至 72 h; 免疫组化显示, CLP 组术后 48 h 肺组织和肾组织内皮细胞中均有大量 C5aR 表达; 与 Sham 组比较, 脾脏单个核细胞中 DC 比例[(1.80 $\pm$ 0.30)% 比 (6.90 $\pm$ 1.20)%, $P<0.05$]及 Treg 比例[(0.38 $\pm$ 0.02)% 比 (4.00 $\pm$ 0.50)%, $P<0.05$]均明显下降, Th17 比例明显升高[(0.83 $\pm$ 0.08)% 比 (0.32 $\pm$ 0.03)%, $P<0.05$], 提示免疫细胞比例失衡, 免疫功能紊乱。给予抗 C5a 单克隆抗体干预后, 小鼠 7 d 累积生存率较 CLP 组明显升高(54.54% 比 30.00%; Log-Rank 检验: $\chi^2=28.090$, $P<0.001$); 血清 TNF- α 、IL-12 和 IFN- γ 水平进一步升高, 而 IL-4 水平明显下降; 肺组织及肾组织 C5aR 表达较 CLP 组显著减少; 脾脏中成熟 DC 比例[(5.10 $\pm$ 1.20)% 比 (1.80 $\pm$ 0.30)%, $P<0.05$]和 Treg 比例[(2.58 $\pm$ 0.05)% 比 (0.38 $\pm$ 0.02)%, $P<0.05$]较 CLP 组明显升高, Th17 比例较 CLP 组明显降低[(0.54 $\pm$ 0.05)% 比 (0.83 $\pm$ 0.08)%, $P<0.05$]。**结论** 初步判断抗 C5a 单克隆抗体可能通过改善脾脏中成熟 DC 及 T 细胞极化状态进而改善脓毒症预后, C5a 在脓毒症细胞免疫调节中发挥重要作用。

【关键词】 补体 C5a; 免疫调节; 脓毒症; 树突细胞

基金项目: 国家自然科学基金(81871593); 天津市教育科研计划项目(2019KJ200); 天津医科大学总医院青年孵育基金(ZYYFY2015012); 天津医科大学朱宪彝纪念医院科研基金(2018ZXY02)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201102-00696

Complement 5a regulates the function of dendritic cells to induce pathogenic polarization of regulatory T cell/helper T cell 17 in sepsis

Qi Anlong^{1,2}, Wang Tong³, Chai Yanfen¹, Zhang Jianning^{2,4}

¹Department of Emergency Medicine, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ²Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ³NHC Key Laboratory of Hormones and Development (Tianjin Medical University), Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Department of Critical Care Medicine, Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital and Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300170, China; ⁴Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Zhang Jianning, Email: jianningzhang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of complement 5a (C5a) in the pathogenesis of sepsis. **Methods** SPF male C57BL/6J mice were selected and divided into sham operation group (Sham group), cecal ligation and puncture (CLP) group and CLP+anti-C5A monoclonal antibody intervention group (CLP+anti-C5a group) according to random number table with 20 mice in each group. A CLP model was reproduced to induce sepsis, and those in the Sham group only underwent laparotomy without ligation and perforation. In the CLP+anti-C5a group, 0.15 mg of anti-C5a monoclonal antibody was injected intraperitoneally immediately after CLP, and in the Sham group and CLP group were given equal amount of normal saline. The cumulative survival rate was analyzed by Kaplan-Meier method. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-12, IL-4), and interferon- γ (IFN- γ) were measured 24, 48 and 72 hours after operation by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemical

staining was used to observe the expression of C5a receptor (C5aR) in lung and kidney tissues 48 hours after operation. The proportions of dendritic cell (DC), regulatory T cell (Treg) and helper T cell 17 (Th17) in splenic mononuclear cells 48 hours after operation were analyzed by flow cytometry. **Results** The 7-day cumulative survival rate of mice in the CLP group was significantly lower than that in the Sham group (30.00% vs. 100.00%; Log-Rank test: $\chi^2 = 47.470$, $P < 0.001$), and the peripheral blood inflammatory mediators TNF- α , IL-12 and IL-4 were increased 24 hours after operation, followed by a significant decreasing at 48 hours, and then gradually increased at 72 hours. IFN- γ gradually increased 24 hours after operation and lasted for 72 hours. Immunohistochemistry showed that a large number of C5aR was expressed in pulmonary and renal endothelial cells 48 hours after operation in the CLP group. Compared with the Sham group, the proportion of DC [(1.80 $\pm$ 0.30)% vs. (6.90 $\pm$ 1.20)%, $P < 0.05$] and Treg [(0.38 $\pm$ 0.02)% vs. (4.00 $\pm$ 0.50)%, $P < 0.05$] in splenic mononuclear cells was down-regulated in the CLP group, the proportion of Th17 was up-regulated [(0.83 $\pm$ 0.08)% vs. (0.32 $\pm$ 0.03)%, $P < 0.05$], and disorder of immune function was found. After anti-C5A monoclonal antibody intervention, the 7-day cumulative survival rate increased significantly compared with the CLP group (54.54% vs. 30.00%; Log-Rank test: $\chi^2 = 28.090$, $P < 0.001$); TNF- α , IL-12 and IFN- γ were further increased, while IL-4 was significantly decreased; the expression of C5aR in lung and kidney tissues were significantly decreased, and the expression of mature DC cells [(5.10 $\pm$ 1.20)% vs. (1.80 $\pm$ 0.30)%, $P < 0.05$] and Treg [(2.58 $\pm$ 0.05)% vs. (0.38 $\pm$ 0.02)%, $P < 0.05$] in spleen were significantly increased compared with the CLP group, and Th17 was significantly decreased [(0.54 $\pm$ 0.05)% vs. (0.83 $\pm$ 0.08)%, $P < 0.05$]. **Conclusion** It is preliminarily concluded that anti-C5A monoclonal antibody may improve the prognosis of sepsis by improving the polarization of mature DC and T cells in the spleen, and C5a plays an important role in the immune regulation of sepsis cells.

【Key words】 Complement 5a; Immunoregulation; Sepsis; Dendritic cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81871593); Science and Technology Development Fund of Tianjin Education Commission for Higher Education of China (2019KJ200); Youth Incubation Fund of Tianjin Medical University General Hospital of China (ZYYFY2015012); Scientific Research Funding of Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital of China (2018ZXY02)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201102-00696

脓毒症是危害人类健康的常见病和多发病,是一种极其复杂的综合征。脓毒症时发生显著的凝血过度激活、抗凝紊乱和纤溶失衡^[1],导致血管内广泛微血栓形成,进展为弥散性血管内凝血,是脓毒症多器官功能衰竭致死的主要病因^[2]。脓毒症因高病死率及高医疗费用一直是国内外研究的热点,虽然早期液体复苏、抗菌药物治疗、营养代谢及重要器官辅助支持已取得长足进步,但严重脓毒症病死率仍居高不下。因此,深化对脓毒症的认识,进一步探究其可能的治疗靶点具有重要的理论及临床意义。

补体系统在脓毒症发病机制中起着重要作用。脓毒症早期,补体系统“瀑布样”释放激活一系列具有炎性介质作用的活性片段(如补体 C3a、C4a 和 C5a 等),其中以 C5a 的活性最强。已经证实,在脓毒症条件下 C3a 和 C5a 的过度释放是导致炎症反应的关键因素^[3]; Gressner 等^[4]研究证实,重症监护病房脓毒症患者的预后与 C5a 的水平密切相关。C5a 是一种强效的具有多种功能的促炎蛋白,近年来其在免疫调节中的作用越来越受到人们关注^[5]。

树突细胞(dendritic cell, DC)是目前所知体内功能最强的专职抗原呈递细胞,可刺激初始型 T 细胞增殖,是机体免疫反应的始动者。DC 是机体免疫系统的重要调节细胞,其免疫调节作用在脓毒症发病及治疗中均有重要意义,以 DC 功能状态及其免疫调节作用为靶点,开发、设计针对相关疾病新的治

疗方案和策略是目前研究的热点^[6-7]。鉴于此,深入探讨脓毒症发展过程中 C5a 对 DC 免疫功能状态及其免疫调节作用的影响具有重要的理论及实践意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物:6~8 周龄 SPF 清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 19~22 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2019-0008。动物用标准颗粒饲料喂养,自由饮水摄食,室温控制在 19~21℃,动物饲养设施符合相关标准。本实验中动物处理措施均符合动物福利与伦理的相关规定,并经过天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会的审查(审批号:IRB2020-DW-18)。

1.2 实验分组及小鼠盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)模型的建立:将小鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、CLP 组和 CLP+抗 C5a 单克隆抗体(单抗)干预组(CLP+anti-C5a 组),每组 20 只。小鼠于实验前 12 h 禁食,肌肉注射盐酸氯胺酮:速眠新 II:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)为 1:1.5:2.5 的混合液 2 mL/kg 麻醉。麻醉满意后,将小鼠仰卧位固定在手术台上,胸腹部常规消毒铺巾,剑突下 1 cm 处做腹正中切口,切口长度为 1.5 cm;暴露盲肠,于 1/2 处结扎,并用 21 G 针头避开血管贯穿结扎的盲肠 1 次。确认无活动出血后,将盲肠还纳腹腔,缝合腹壁切口^[8]。Sham 组只开腹不进行结扎穿孔。术后均于颈后皮肤常规消

毒,皮下注射生理盐水 1 mL 液体复苏,麻醉苏醒后单笼饲养。CLP+anti-C5a 组于制模后立即腹腔注射抗 C5a 单抗 0.15 mg; Sham 组和 CLP 组给予等量生理盐水。术后记录各组小鼠 7 d 生存情况。

1.3 炎症因子检测: 分别于术后 24、48、72 h 处死 6 只小鼠取眼球血,收集血清样本,用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukins, IL-12、IL-4)及 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平。

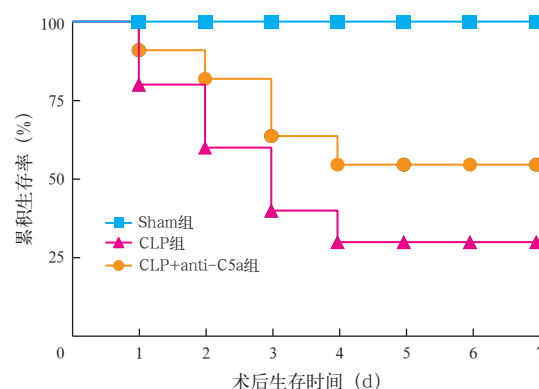
1.4 免疫组化法观察肺组织和肾组织中 C5a 受体(C5a receptor, C5aR)表达: 于术后 48 h 处死 6 只小鼠,取肺组织及肾组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定后,依次脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片,置于含 3% 过氧化氢的 10 mmol/L PBS 中处理 15 min 以封闭内源性过氧化物酶活性;用正常羊血清继续封闭 10 min;加入一抗(小鼠抗人 C5aR 短肽单抗, 1:250), 4 °C 孵育过夜;加入二抗(生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 1:200), 37 °C 孵育 1 h;然后用 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)-过氧化氢显色液显色。取出组织切片,中性树脂胶封片,覆盖盖玻片,避免产生气泡,光镜下观察、拍照并留存。C5a 受体阳性表达为细胞膜和细胞质呈黄色或棕黄色颗粒。

1.5 流式细胞仪检测免疫细胞亚群的水平: 于术后 48 h 处死 6 只小鼠,无菌取出脾脏研磨混匀,离心后加入淋巴细胞分离液,离心 15 min 提取单个核细胞。收集细胞用冷 PBS 清洗 2 次,置于流式上样管(每管 1×10^6 个细胞),加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 CD4 抗体、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的抗小鼠 CD25 抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠 / 大鼠 IL-17 抗体、PE 标记的抗小鼠 / 大鼠叉头翼状转录因子 P3(forkhead/winged helix transcription factor P3, FoxP3)抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD80 抗体、PE 标记的抗小鼠 CD86 抗体、APC 标记的抗小鼠维甲酸相关孤儿核受体 γ t(retinoic acid-related orphan receptor γ t, ROR γ t)抗体或 APC 标记的抗小鼠主要组织相容性复合物 II 类分子(major histocompatibility complex II, MHC II)抗体, 4 °C 避光孵育 30 min,冷 PBS 清洗未结合抗体,重悬后用流式细胞仪检测脾单个核细胞中 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)及 CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺辅助性 T 细胞 17(Th17)亚群变化。

1.6 统计学方法: 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,应用 Graphpad Prism 5 软件制图。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。样本满足方差齐性采用 LSD 法,否则采用 Tamhane T_2 法。采用 Kaplan-Meier 法分析小鼠 7 d 累积生存率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

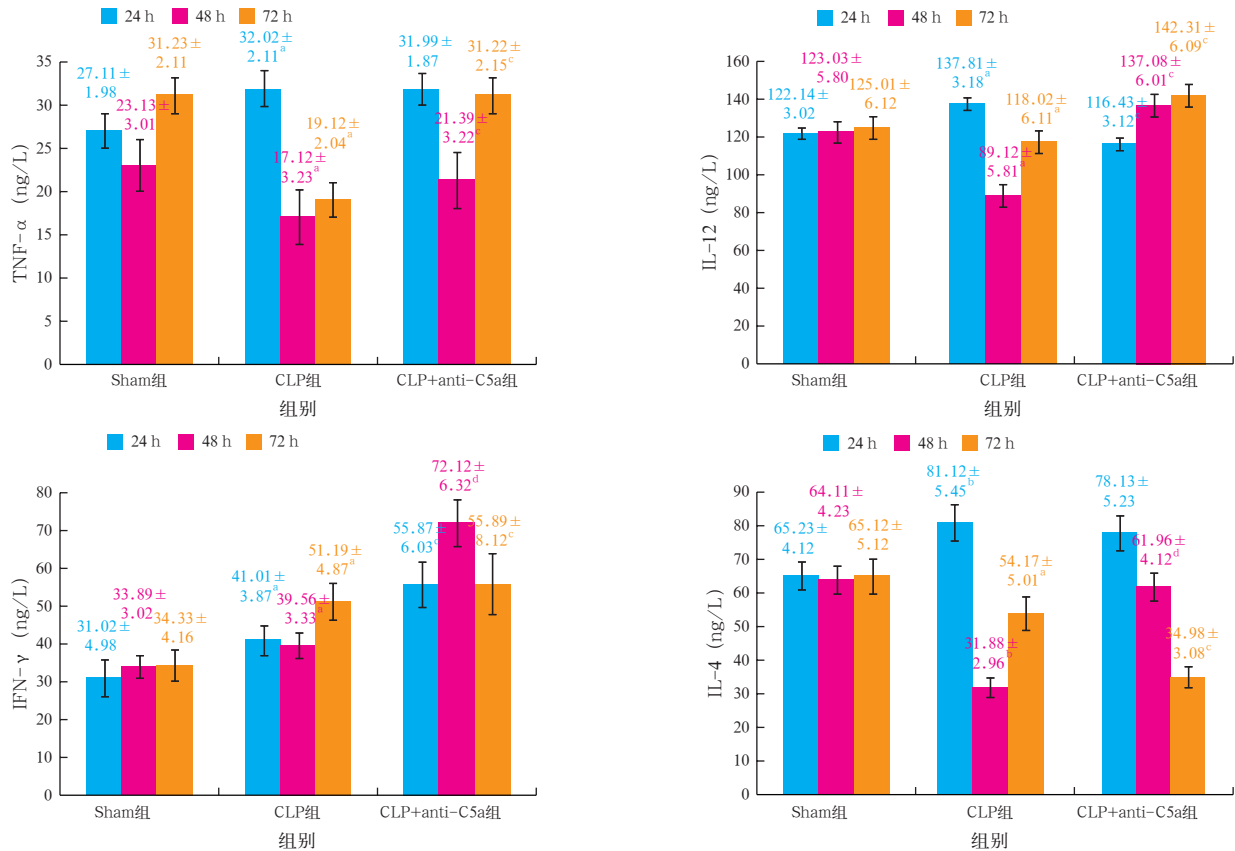
2.1 抗 C5a 单抗对 CLP 小鼠 7 d 累积生存率的影响(图 1): 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠术后 7 d 累积生存率明显降低(30.00% 比 100.00%; Log-Rank 检验: $\chi^2 = 47.470$, $P < 0.001$); 而 CLP+anti-C5a 组 7 d 累积生存率较 CLP 组明显升高(54.54% 比 30.00%; Log-Rank 检验: $\chi^2 = 28.090$, $P < 0.001$)。



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型组, CLP+anti-C5a 组为抗 C5a 单克隆抗体干预组

图 1 各组小鼠术后 7 d Kaplan-Meier 生存曲线

2.2 抗 C5a 单抗对 CLP 小鼠外周血炎症因子的影响(图 2): 通过生存曲线发现, CLP 术后 24、48、72 h 是 CLP 小鼠死亡高峰期, 因此进一步观察抗 C5a 单抗对 CLP 小鼠术后这 3 个时间点外周血炎症因子水平的影响。结果显示, 与 Sham 组比较, CLP 组血清 TNF- α 、IL-12、IL-4 于术后 24 h 明显升高, 48 h 转而迅速下降, 并持续到 72 h (均 $P < 0.05$); IFN- γ 则随术后时间延长持续升高至 72 h (均 $P < 0.05$)。给予抗 C5a 单抗干预后, 血清 TNF- α 水平于 48 h 较 CLP 组明显升高, 并持续至 72 h (均 $P < 0.05$); IL-12 于 24 h 较 CLP 组短暂下降后, 于 48 h 明显升高, 并维持高水平至 72 h (均 $P < 0.05$); IFN- γ 于 24 h 较 CLP 组明显升高, 并持续至 72 h (均 $P < 0.05$); IL-4 于 48 h 较 CLP 组明显升高后, 于 72 h 明显下降 (均 $P < 0.05$)。提示各组炎症因子比较均于 48 h 出现统计学差异, 可能为干预提供了时间节点。



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型组, CLP+anti-C5a 组为抗 C5a 单克隆抗体干预组; TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, IL-12 为白细胞介素-12, IFN-γ 为 γ-干扰素, IL-4 为白细胞介素-4; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 CLP 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

图 2 各组小鼠术后不同时间点外周血炎症因子水平变化比较

2.3 抗 C5a 单抗对 CLP 小鼠靶器官中 C5aR 表达的影响 (图 3): 根据 7 d 生存曲线分析和外周血炎症因子变化实验结果观察到, CLP 小鼠术后 48 h 累积生存率显著下降, 且炎症反应变化最为显著, 故于术后 48 h 取小鼠肺组织及肾组织进行免疫组化染色, 以观察靶器官中 C5aR 表达的变化。结果显示, Sham 组小鼠肺组织及肾组织中仅有少量 C5aR 表达; CLP 组术后 48 h 肺组织和肾组织内皮细胞中均有大量 C5aR 表达; 而给予抗 C5a 单抗干预后, 肺组织及肾组织中 C5aR 表达均较 CLP 组显著减少。

2.4 抗 C5a 单抗对 CLP 小鼠脾脏免疫细胞水平的影响 (图 4 ~ 5): 选取 CLP 术后 48 h 进行流式细胞仪分析发现, CLP 组小鼠脾脏 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺ DC 及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 细胞比例均较 Sham 组明显下降, CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺Th17 细胞比例较 Sham 组明显升高 (均 $P < 0.05$); 给予抗 C5a 单抗干预后, CD80⁺CD86⁺MHC II⁺ DC 和 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 细胞比例较 CLP 组明显升高, CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺Th17 细胞比例较 CLP 组明显下降 (均 $P < 0.05$)。

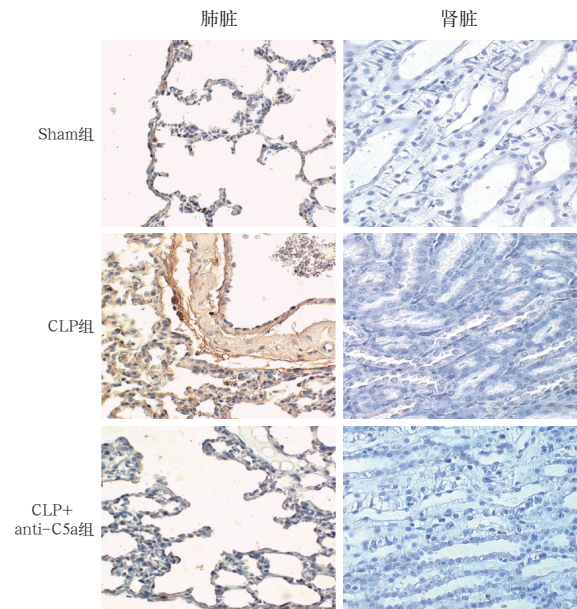
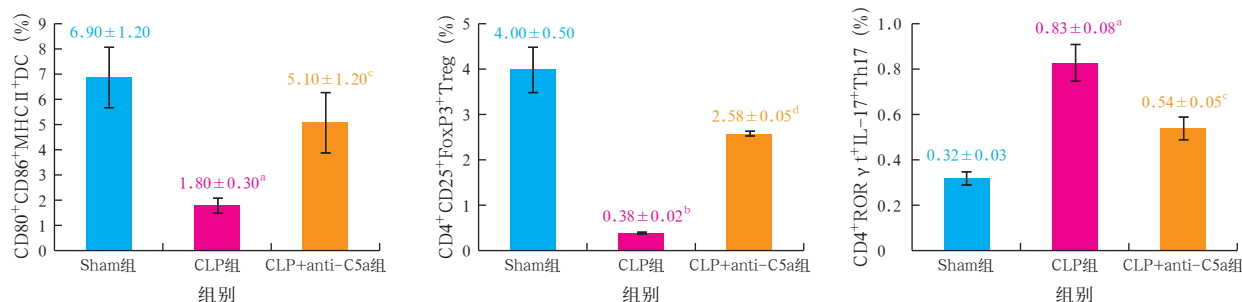
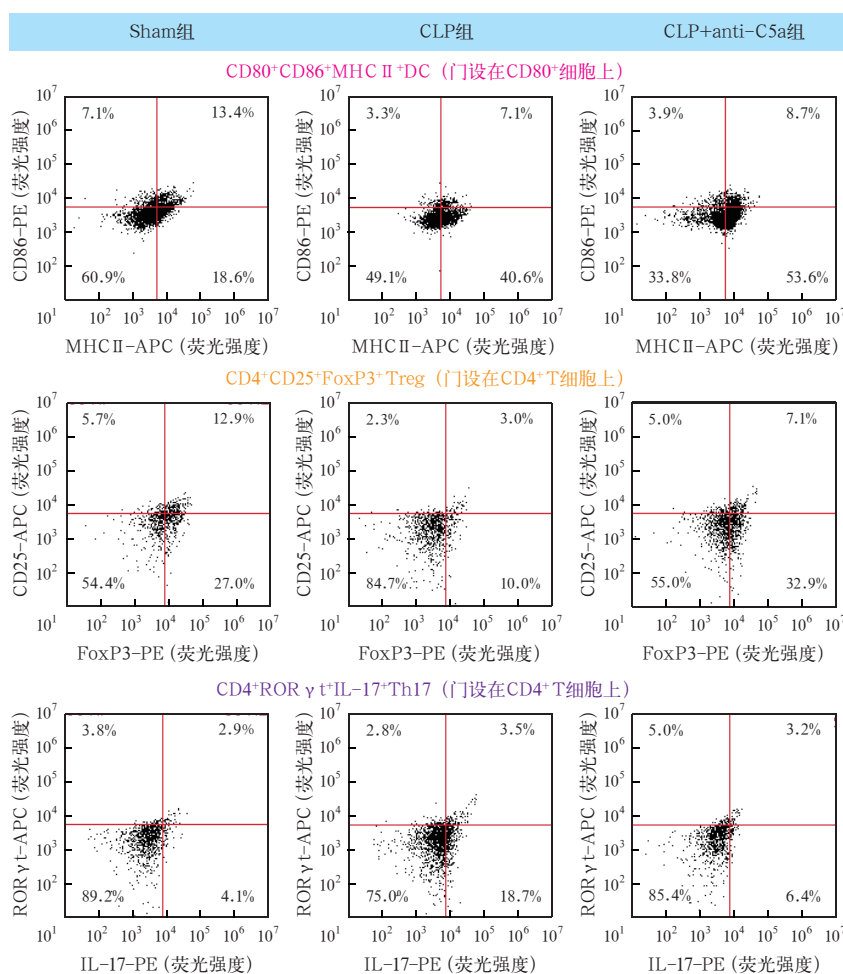


图 3 光镜下观察各组小鼠术后 48 h 肺组织和肾组织补体 C5a 受体 (C5aR) 表达 C5aR 阳性表达为细胞膜和细胞质呈黄色或棕黄色颗粒。假手术组 (Sham 组) 肺组织和肾组织有少量 C5aR 表达; 盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型组 (CLP 组) 肺组织和肾组织内皮细胞中有大量 C5aR 表达; CLP+抗 C5a 单克隆抗体干预组 (CLP+anti-C5a 组) 肺组织和肾组织中 C5aR 表达较 CLP 组明显减少 免疫组化染色 高倍放大



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型组, CLP+anti-C5a 组为抗 C5a 单克隆抗体干预组; MHC II 为主要组织相容性复合物 II 类分子, DC 为树突细胞, FoxP3 为叉头翼状转录因子 P3, Treg 为调节性 T 细胞, RORγt 为维甲酸相关孤核受体 γt, IL-17 为白细胞介素-17, Th17 为辅助性 T 细胞 17; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 CLP 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

图 4 各组小鼠术后 48 h 脾脏免疫细胞表达比较



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型组, CLP+anti-C5a 组为抗 C5a 单克隆抗体干预组; MHC II 为主要组织相容性复合物 II 类分子, DC 为树突细胞, FoxP3 为叉头翼状转录因子 P3, Treg 为调节性 T 细胞, RORγt 为维甲酸相关孤核受体 γt, IL-17 为白细胞介素-17, Th17 为辅助性 T 细胞 17, APC 为别藻蓝蛋白, PE 为藻红蛋白

图 5 流式细胞仪检测各组小鼠术后 48 h 脾脏免疫细胞水平

3 讨论

细胞免疫功能紊乱是脓毒症发病的重要病理生理机制,且主要表现为细胞免疫功能抑制^[9-10]。DC 是免疫系统的关键调节细胞,其功能状态对 T 淋巴细胞的活化、增殖、分化至关重要^[11]。近年来, C5a

在免疫调节中的作用越来越受人们的关注^[5, 12]。本研究中通过给予抗 C5a 单抗干预发现, CLP 小鼠脾脏中 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC 及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 亚群比例上调, CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺Th17 亚群比例下调,并伴随炎症因子动态改变,肺组织及肾组织 C5aR 表达降低,生存率提高。

作为免疫系统的抗原呈递细胞和机体免疫反应启动者, DC 通过血液在全身分布,反映微生物及细胞损伤、低氧、缺血/再灌注等引起的内环境变化。DC 前体细胞由骨髓入外周血,分布至全身各组织中成为未成熟 DC,表达低水平辅助刺激分子和黏附分子,但具有极强的抗原内吞和加工处理能力;未成熟 DC 在摄取抗原或接受某些刺激因素后可分化成熟, MHC 分子、共刺激分子、黏附分子的表达均显著增加^[13]。DC 通过一系列趋化因子和膜受体表达实现 DC 与 T 细胞间相互作用,选择性诱导 T 淋巴细胞分化成为 Th1、Th2、Th17 或 Treg,从而调控 T 淋巴细胞免疫应答类型^[13]。Treg 是

近年来发现有较强免疫抑制活性的 T 细胞亚群^[14]。研究表明, Treg 不仅有免疫抑制作用,还可通过激活内皮细胞促进组织损伤修复^[15]。业内认为, Treg 可介导免疫发生程度以及防止因过度免疫反应导致的组织损伤,因而在脓毒症发病机制中起着关键作

用^[16-18]。DC 介导的 Treg/Th17 平衡在脓毒症细胞免疫功能障碍中的作用越来越受到重视^[19]。

既往研究显示, C5a 通过直接作用于血管内皮细胞增加血管通透性, 刺激平滑肌痉挛、收缩, 并对嗜碱粒细胞、中性粒细胞、单核/巨噬细胞、肥大细胞发挥趋化作用, 诱导单核细胞分泌 IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF- α 等细胞因子^[5]。通过阻断 C5a 可以减少胸腺细胞凋亡, 维持中性粒细胞免疫功能^[20]。研究表明, C5a 可诱导 IL-12⁺DC 细胞迁移^[21]。本研究中通过 CLP 构建脓毒症小鼠模型, 发现小鼠脾脏内 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC 及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 亚群明显下调, CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺Th17 亚群明显上调, 证实脓毒症小鼠外周免疫障碍, 与其他研究结果一致^[11]; 给予抗 C5a 单抗干预后, 外周血中 IL-12 等表达明显上调, 同时 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC 以及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 亚群上调, CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺Th17 亚群下调, 与其外周血相应炎症因子水平一致。

脓毒症后脾脏 DC 表型表达异常, 抗原呈递功能障碍, 表现为脾 DC 体外摄取能力降低, 表面 CD86、CD80 表达下降。同时, T 淋巴细胞增殖反应低下、IL-2 表达降低、T 淋巴细胞向 Th2 漂移^[11, 19]。本研究结果证实, CLP 小鼠脾脏 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例下降可加剧靶器官受损程度, 增加死亡率; 外源性补充抗 C5a 单抗干预后, CLP 小鼠生存率升高, 肺组织及肾组织 C5aR 沉积减少, 脾脏 CD80⁺CD86⁺MHC II⁺DC、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 上调, CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺Th17 下调。

综上所述, 本研究应用 CLP 构建脓毒症模型并进行了抗 C5a 单抗干预实验, 证实抗 C5a 单抗可以提高 CLP 小鼠脾脏中 CD80、CD86 及 MHC II 高表达的 DC 亚群比例, 调整了 Treg/Th17 平衡, 通过改善脓毒症细胞免疫功能紊乱, 减轻了肺脏和肾脏靶器官损伤, 提高了 CLP 小鼠生存预后。本实验虽然对深入阐明脓毒症发病机制、探索有效干预手段具有重要价值, 但抗 C5a 单抗发挥作用的分子生物学机制及作用靶点尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国医疗保健国际交流促进会急诊医学分会, 中华医学会急诊医学分会, 中国医师协会急诊医师分会, 中国人民解放军急救医学专业委员会. 中国“脓毒症早期预防与阻断”急诊专家共识[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (5): 518-530. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200514-00414. Emergency Medicine Branch of Chinese Medical Care International Exchange Promotion Association, Emergency Medical Branch of Chinese Medical Association, Chinese Medical Doctor Association

Emergency Medical Branch, Chinese People's Liberation Army Emergency Medicine Professional Committee. Consensus of Chinese experts on early prevention and blocking of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (5): 518-530. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200514-00414.

[2] van der Poll T, Herwaldt H. The coagulation system and its function in early immune defense [J]. Thromb Haemost, 2014, 112 (4): 640-648. DOI: 10.1160/TH14-01-0053.

[3] Guo RF, Huber-Lang M, Wang X, et al. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis [J]. J Clin Invest, 2000, 106 (10): 1271-1280. DOI: 10.1172/JCI10793; 10.1172/JCI10793.

[4] Gressner OA, Koch A, Sanson E, et al. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients: no enhancing effect by actin-free Gc-globulin [J]. Clin Biochem, 2008, 41 (12): 974-980. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.05.005.

[5] Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 821-852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835.

[6] 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.

[7] Qi AL, Wu Y, Dong N, et al. Recombinant human ulinastatin improves immune dysfunction of dendritic cells in septic mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress-related apoptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106643. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106643.

[8] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31-36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.

[9] Cao C, Yu M, Chai Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (10): 782. DOI: 10.1038/s41419-019-2015-1.

[10] 高经华, 刘喆滢, 刘志锋. 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.

[11] Bouras M, Asehnoune K, Roquilly A. Contribution of dendritic cell responses to sepsis-induced immunosuppression and to susceptibility to secondary pneumonia [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2590. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02590.

[12] Nguyen H, Kuril S, Bastian D, et al. Complement C3a and C5a receptors promote GVHD by suppressing mitophagy in recipient dendritic cells [J]. JCI Insight, 2018, 3 (24): e121697. DOI: 10.1172/jci.insight.121697.

[13] Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity [J]. Cell, 2001, 106 (3): 259-262. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00456-1.

[14] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance [J]. Cell, 2008, 133 (5): 775-787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.

[15] DiSpirito JR, Zemmour D, Ramanan D, et al. Molecular diversification of regulatory T cells in nonlymphoid tissues [J]. Sci Immunol, 2018, 3 (27): eaat5861. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat5861.

[16] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8 (7): 523-532. DOI: 10.1038/nri2343.

[17] 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.

[18] Bao R, Hou J, Li Y, et al. Adenosine promotes Foxp3 expression in Treg cells in sepsis model by activating JNK/AP-1 pathway [J]. Am J Transl Res, 2016, 8 (5): 2284-2292.

[19] Gupta DL, Bhoi S, Mohan T, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis [J]. Cytokine, 2016, 88: 214-221. DOI: 10.1016/j.cyt.2016.09.010.

[20] Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, et al. Protective effects of C5a blockade in sepsis [J]. Nat Med, 1999, 5 (7): 788-792. DOI: 10.1038/10512; 10.1038/10512.

[21] Ma N, Xing C, Xiao H, et al. C5a regulates IL-12⁺ DC migration to induce pathogenic Th1 and Th17 cells in sepsis [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e69779. DOI: 10.1371/journal.pone.0069779.

(收稿日期: 2020-11-02)