

组蛋白甲基转移酶 EZH2 调控脓毒症诱导的 T 细胞功能障碍的作用及分子机制

李哲^{1,2} 赵冬阳¹ 周晓慧³ 唐伦先¹

¹ 同济大学附属东方医院急诊内科, 上海 200120; ² 同济大学医学院, 上海 200120; ³ 同济大学附属东方医院转化医学研究中心, 上海 200120

通信作者: 唐伦先, Email: 456tlx@163.com

【摘要】 目的 探讨组蛋白甲基转移酶果蝇 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 调控脓毒症 T 淋巴细胞功能失调的作用及机制。**方法** 按随机数字表法将 24 只雄性 C57BL/6 小鼠分为假手术组、脓毒症模型组〔盲肠结扎穿孔术 (CLP)+ 二甲基亚砜 (DMSO) 组〕及 EZH2 选择性抑制剂干预组 (CLP+GSK126 组), 每组 8 只。采用 CLP 法制备脓毒症小鼠模型; 假手术组小鼠不结扎穿孔刺盲肠, 其余操作同 CLP+DMSO 组。CLP+DMSO 组及 CLP+GSK126 组小鼠术后立即分别腹腔注射 DMSO 或 GSK126 (10 mg/kg)。术后 24 h 处死小鼠取肠系膜淋巴结, 采用流式细胞仪检测 T 淋巴细胞 EZH2 表达、T 淋巴细胞凋亡率、细胞增殖标志物 ki-67 抗原阳性 T 淋巴细胞 (ki-67⁺) 比例、 γ -干扰素阳性 T 淋巴细胞 (IFN- γ ⁺) 比例、程序性死亡受体-1 阳性 T 淋巴细胞 (PD-1⁺) 比例及程序性死亡配体-1 阳性 T 淋巴细胞 (PD-L1⁺) 比例。**结果** 与假手术组相比, CLP+DMSO 组小鼠肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞 EZH2 表达升高。与 CLP+DMSO 组相比, CLP+GSK126 组小鼠肠系膜淋巴结 CD3⁺ 比例升高 (0.70 ± 0.02 比 0.50 ± 0.07, $P < 0.01$), 表明抑制 EZH2 可增加脓毒症小鼠淋巴结 T 淋巴细胞数量; 同时, CLP+GSK126 组淋巴结 CD4⁺ 及 CD8⁺ 细胞中 ki-67⁺ 比例显著上升 (CD4⁺: 0.74 ± 0.05 比 0.63 ± 0.04, CD8⁺: 0.82 ± 0.06 比 0.70 ± 0.04, 均 $P < 0.05$), 表明抑制 EZH2 可增加脓毒症小鼠淋巴结增殖活性较高的 T 淋巴细胞比例; 另外, CLP+GSK126 组小鼠肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞凋亡率与 CLP+DMSO 组比较差异无统计学意义 [CD4⁺: (21.53 ± 2.87)% 比 (20.48 ± 3.21)%, CD8⁺: (8.34 ± 1.02)% 比 (7.71 ± 1.38)%, 均 $P > 0.05$], 表明抑制 EZH2 对脓毒症小鼠淋巴结 T 淋巴细胞凋亡无明显影响。与 CLP+DMSO 组相比, CLP+GSK126 组小鼠肠系膜淋巴结 IFN- γ ⁺CD4⁺、IFN- γ ⁺CD8⁺ 比例也显著增加 (IFN- γ ⁺CD4⁺: 0.31 ± 0.11 比 0.14 ± 0.06, IFN- γ ⁺CD8⁺: 0.30 ± 0.10 比 0.13 ± 0.06, 均 $P < 0.05$), 表明抑制 EZH2 可增强脓毒症小鼠淋巴结 T 淋巴细胞 IFN- γ 分泌能力; 同时, CLP+GSK126 组小鼠肠系膜淋巴结 PD-1⁺CD8⁺ 比例较 CLP+DMSO 组显著下降 (0.092 ± 0.006 比 0.135 ± 0.004, $P < 0.01$), 表明抑制 EZH2 可降低脓毒症小鼠淋巴结 CD8⁺ 细胞 PD-1 的表达量, 但对 PD-L1⁺ 比例无明显影响。**结论** EZH2 参与了脓毒症诱导的 T 淋巴细胞功能障碍的调控, 该作用可能部分通过调节 PD-1 表达介导。

【关键词】 脓毒症; T 淋巴细胞; 组蛋白甲基转移酶; EZH2 选择性抑制剂 GSK126; 程序性死亡受体-1

基金项目: 国家自然科学基金 (81970072); 上海市科技计划项目 (20Y11901200); 上海市浦东新区医药卫生领先人才培养计划项目 (PWR12019-05)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210906-01323

Effects and molecular mechanism of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 on regulating sepsis-induced T cell dysfunction

Li Zhe^{1,2}, Zhao Dongyang¹, Zhou Xiaohui³, Tang Lunxian¹

¹Department of Emergency Medicine and Critical Care, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

²Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China; ³Translational Medicine Research Center, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

Corresponding author: Tang Lunxian, Email: 456tlx@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) on sepsis-induced T cell dysfunction. **Methods** Twenty-four male C57BL/6 mice were divided into three groups randomly: sham operated group, sepsis model group [cecum ligation and puncture (CLP)+dimethyl sulfoxide (DMSO) group] and EZH2 selective inhibitor treated group (CLP+GSK126 group), with 8 mice in each group. Sepsis murine model was reproduced by CLP. CLP+DMSO group and CLP+GSK126 group were treated with DMSO or GSK126 (10 mg/kg) respectively right after surgery through intraperitoneal injection. The mice were sacrificed 24 hours after operation, and the mesenteric lymph nodes were collected. The expression of EZH2, apoptosis rates, cell proliferation marker ki-67 antigen positive T lymphocytes (ki-67⁺ cell), interferon- γ positive T lymphocytes (IFN- γ ⁺ cell), programmed death receptor-1 positive T lymphocytes (PD-1⁺ cell) and programmed death-ligand 1 positive T lymphocytes (PD-L1⁺ cell) were determined by flow cytometry. **Results** Compared with sham operated group, the expression of EZH2 in T lymphocytes was up-regulated on mesenteric lymph nodes of CLP+DMSO group. Compared with CLP+DMSO

group, the ratio of CD3⁺ T lymphocytes in CLP+GSK126 group was up-regulated (0.70 ± 0.02 vs. 0.50 ± 0.07 , $P < 0.01$), indicating that the EZH2 inhibitor could increase the number of T lymphocytes in lymph nodes of septic mice; the ratio of ki-67⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in CLP+GSK126 group was increased (CD4⁺: 0.74 ± 0.05 vs. 0.63 ± 0.04 , CD8⁺: 0.82 ± 0.06 vs. 0.70 ± 0.04 , both $P < 0.05$), indicating that the EZH2 inhibitor could increase the ratio of T lymphocytes with high proliferative activity in lymph nodes of septic mice. However, no significant difference was found on both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes apoptosis rates in the mesenteric lymph nodes of mice between CLP+GSK126 group and CLP+DMSO group [CD4⁺: (21.53 ± 2.87)% vs. (20.48 ± 3.21)%, CD8⁺: (8.34 ± 1.02)% vs. (7.71 ± 1.38)%, both $P > 0.05$], indicating that no extra T lymphocytes apoptosis was induced by EZH2 inhibitor. Compared with CLP+DMSO group, the ratios of IFN- γ ⁺ CD4⁺ and IFN- γ ⁺ CD8⁺ T lymphocytes were increased in CLP+GSK126 group (IFN- γ ⁺ CD4⁺: 0.31 ± 0.11 vs. 0.14 ± 0.06 , IFN- γ ⁺ CD8⁺: 0.30 ± 0.10 vs. 0.13 ± 0.06 , both $P < 0.05$), suggesting that secretion of IFN- γ in lymph nodes by sepsis T lymphocytes was augmented after EZH2 inhibitor administration. Furthermore, compared with CLP+DMSO group, the ratio of PD-1⁺ cell in CD8⁺ T lymphocyte was down-regulated in CLP+GSK126 group (0.092 ± 0.006 vs. 0.135 ± 0.004 , $P < 0.01$), suggesting that EZH2 inhibitor restrained the PD-1 expression on sepsis lymphoid node CD8⁺ T lymphocytes, however, it had no significant effect on PD-L1⁺ cells. **Conclusion** EZH2, regulates sepsis-induced T lymphocyte dysfunction, possibly through modulating the expression of PD-1.

【Key words】 Sepsis; T lymphocyte; Histone methyltransferase; EZH2 selective inhibitor GSK126; Programmed death receptor-1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81970072); Shanghai Science and Technology Commission Program (20Y11901200); Outstanding Leaders Training Program of Pudong Health Bureau of Shanghai (PWR12019-05)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210906-01323

脓毒症是一种由于机体对炎症反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍^[1]。近来研究提示,脓毒症患者渡过急性期后存在明显的免疫抑制和较高的死亡风险^[2]。脓毒症所致的免疫抑制主要表现为淋巴细胞功能失调、抗原呈递细胞重编程和中性粒细胞病原清除能力下降等。其中,T淋巴细胞的“耗竭”和“失能”是最突出的病理生理改变^[3]。果蝇 zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是一种组蛋白甲基转移酶,通过催化靶基因组蛋白的甲基化状态进而影响其表达^[4]。EZH2 在淋巴细胞的发育和成熟过程中扮演重要角色,研究表明其参与了多种炎症性疾病的发生发展^[5]。本课题组前期研究表明,脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞上 EZH2 的表达水平对继发二次感染及死亡结局有较好的预测价值^[6]。因此,本研究旨在通过动物实验进一步探讨 EZH2 是否参与调控了脓毒症 T 淋巴细胞的功能改变及其潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,9~10 周龄,体质量 26~30g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(浙)2019-0001。所有方案均按照同济大学附属东方医院实验动物伦理委员会批准的伦理许可中的准则编制,得到伦理委员会审批(审批号:2019-026)。采用随机数字表法将小鼠分为假手术组、脓毒症模型组〔盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)+二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组〕及 EZH2

选择性抑制剂干预组(CLP+GSK126 组),每组 8 只。

1.2 模型制备及处理:采用 CLP 法构建小鼠脓毒症模型;假手术组小鼠除不结扎穿孔盲肠外,其余操作与 CLP+DMSO 组小鼠相同,详细步骤见本课题组前期研究^[7]。各组小鼠术后立即给予生理盐水 1 mL 皮下注射,CLP+DMSO 组及 CLP+GSK126 组小鼠术后立即分别腹腔注射 DMSO 或 GSK126 (10 mg/kg)。术后 24 h 取小鼠外周血,处死小鼠后取肠系膜淋巴结于预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中,用于后续流式细胞仪检测。

1.3 单细胞悬液制备:脱颈处死小鼠后,钝性分离肠系膜淋巴结,将少许组织块置于 70 μ m 滤网上,加入少许 PBS 研磨, PBS 冲洗 3 次并收集洗液,转移至 15 mL 离心管中,离心 5 min 吸去上清液,重悬细胞沉淀于 300 μ L PBS 缓冲液中,得到单细胞悬液。

1.4 流式细胞仪检测 CD3⁺、程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 阳性 (PD-1⁺)、程序性死亡配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 阳性 (PD-L1⁺) 等细胞比例(表面染色):依照说明书推荐剂量,向每管 1×10^6 个细胞中加入经不同抗体耦联荧光染料进行过表面染色的抗 CD4、CD3、CD8、PD-1、PD-L1 抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加入 2 mL PBS 重悬,离心 5 min 去上清液,200 mL PBS 重悬细胞后上机进行流式检测。

1.5 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞 EZH2 及细胞增殖标志物 ki-67 抗原(ki-67)表达量:T 淋巴细胞表面抗原染色后(步骤同 1.4),加入 1 mL 固定破膜缓冲

液,充分吹打混匀,4℃避光孵育45 min 破膜,加入1~2 mL 破膜洗液,离心5 min 去上清液。依照推荐剂量加入经过表面染色的抗EZH2或ki-67抗体,4℃避光孵育45 min,加入破膜洗液,离心5 min 去上清液,200 mL PBS 重悬细胞后上机进行流式检测。

1.6 流式细胞仪检测γ-干扰素(interferon-γ, IFN-γ)阳性(IFN-γ⁺)细胞比例:在无菌条件下,将预先制备好的单细胞悬液以1×10⁶个/mL的密度接种于RPMI 1640培养基中。加入20 μg/L 佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸盐(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)及1 mg/L 罗奴霉素于培养基中,37℃、5% CO₂ 孵箱孵育4 h,进行流式染色,步骤同1.5。

1.7 流式细胞仪检测凋亡细胞:T淋巴细胞表面抗原染色后(步骤同1.4),将细胞重悬于200 μL 凋亡检测缓冲液中,并加入膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC),4℃避光孵育15 min,加入7-氨基放线菌素D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD),2 min 后上机进行流式检测。

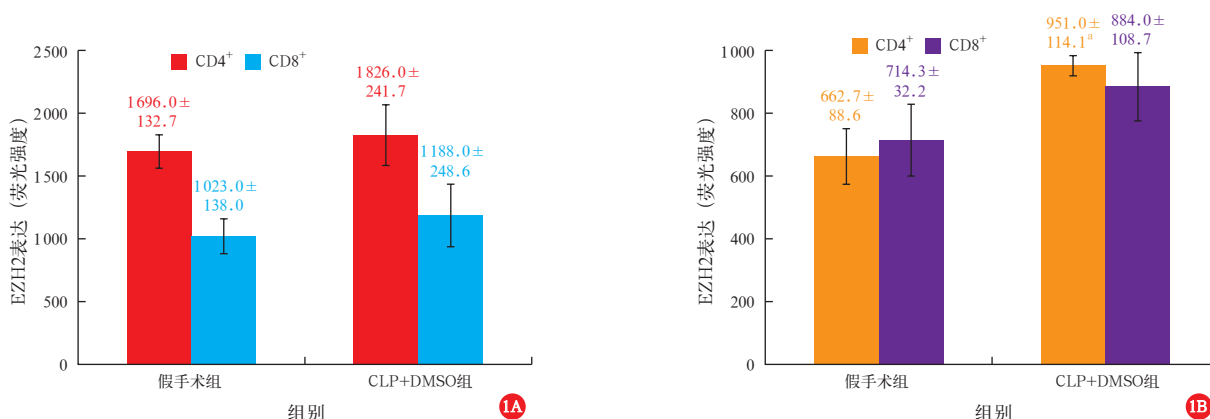
1.8 统计学方法:采用SPSS 20.0软件进行统计分析。所有实验重复3~5次。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验;3组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症小鼠T淋巴细胞EZH2表达升高(图1):与假手术组相比,CLP+DMSO组小鼠外周血T淋巴细胞EZH2表达差异无统计学意义,而肠系膜淋巴结中CD4⁺细胞EZH2表达明显升高($P < 0.05$)。

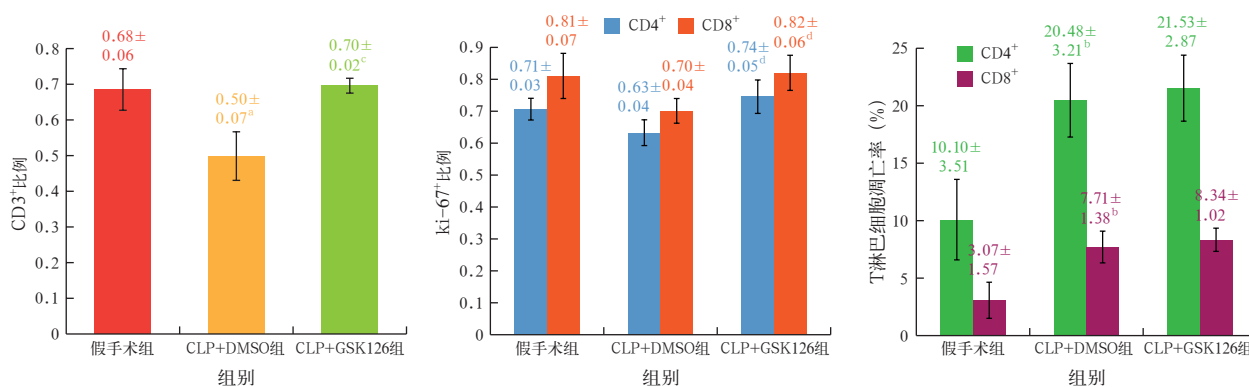
2.2 抑制EZH2可改善T淋巴细胞增殖能力(图2):与假手术组相比,CLP+DMSO组小鼠肠系膜淋巴结中CD3⁺比例显著降低($P < 0.05$);而CLP+GSK126组CD3⁺比例较CLP+DMSO组显著升高($P < 0.01$)。

与假手术组相比,CLP+DMSO组小鼠肠系膜淋巴结ki-67⁺比例下降;给予GSK126干预后,肠系膜淋巴结CD4⁺、CD8⁺细胞ki-67⁺比例均较CLP+DMSO组显著增加(均 $P < 0.05$)。



注:CLP为盲肠结扎穿孔术,DMSO为二甲基亚砜,EZH2为组蛋白甲基转移酶果蝇zeste基因增强子同源物2;与假手术组比较,^a $P < 0.05$

图1 两组小鼠外周血(A)及肠系膜淋巴结(B)T淋巴细胞EZH2表达比较

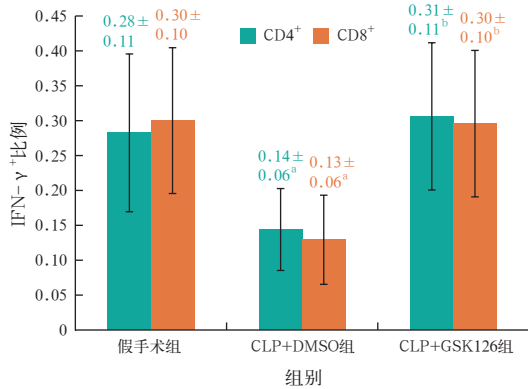


注:CLP为盲肠结扎穿孔术,DMSO为二甲基亚砜,GSK126为组蛋白甲基转移酶选择性抑制剂,ki-67为细胞增殖标志物ki-67抗原;与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与CLP+DMSO组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

图2 各组小鼠肠系膜淋巴结CD3⁺、ki-67⁺T淋巴细胞比例及细胞凋亡率比较

与假手术组相比, CLP+DMSO 组小鼠肠系膜淋巴结 CD4⁺、CD8⁺ 凋亡率显著增加(均 $P < 0.01$); 而 GSK126 对 T 淋巴细胞凋亡率无明显影响。

2.3 抑制 EZH2 可增加 IFN- γ ⁺ 比例(图 3):与假手术组相比, CLP+DMSO 组肠系膜淋巴结中 IFN- γ ⁺ 比例均显著下调(均 $P < 0.05$); 但给予 GSK126 干预后, IFN- γ ⁺ CD4⁺ 及 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 比例均较 CLP+DMSO 组显著回升(均 $P < 0.05$)。

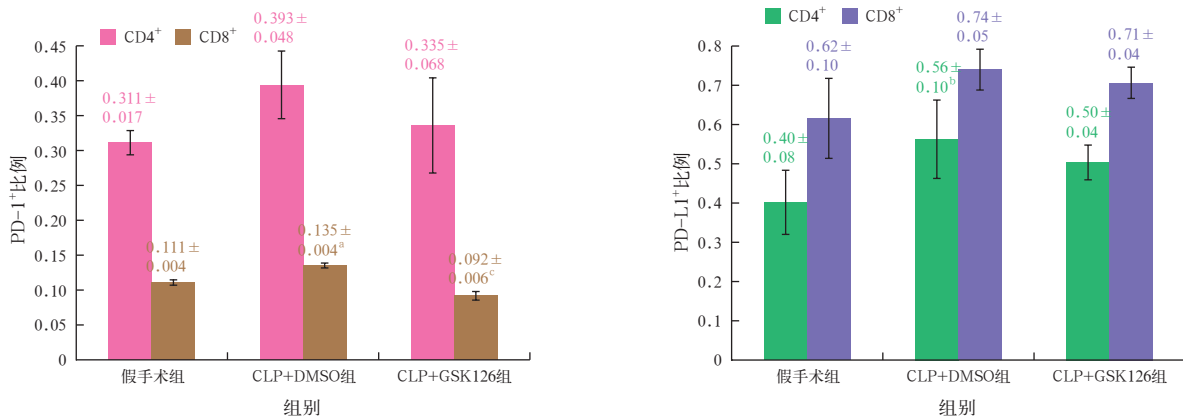


注: CLP 为盲肠结扎穿孔术, DMSO 为二甲基亚砜, GSK126 为组蛋白甲基转移酶选择性抑制剂, IFN- γ 为 γ -干扰素; 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CLP+DMSO 组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 各组小鼠肠系膜淋巴结 IFN- γ ⁺ T 淋巴细胞比例比较

2.4 抑制 EZH2 可降低 PD-1⁺ 比例(图 4):与假手术组相比, CLP+DMSO 组肠系膜淋巴结 PD-1⁺CD8⁺ 的比例显著增加($P < 0.01$); 而给予 GSK126 干预后 PD-1⁺CD8⁺ 比例显著下降($P < 0.01$)。PD-1⁺CD4⁺ 比例有相同趋势, 但各组间差异无统计学意义。

与假手术组相比, CLP+DMSO 组肠系膜淋巴结 PD-L1⁺CD4⁺ 比例较假手术组显著增加($P < 0.05$); 而 GSK126 对 PD-L1⁺CD4⁺ 比例无明显影响。PD-L1⁺CD8⁺ 比例趋势相同, 但各组间差异无统计学意义。



注: CLP 为盲肠结扎穿孔术, DMSO 为二甲基亚砜, GSK126 为组蛋白甲基转移酶选择性抑制剂, PD-1 为程序性死亡受体-1, PD-L1 为程序性死亡配体-1; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 CLP+DMSO 组比较, ^c $P < 0.01$

图 4 各组小鼠肠系膜淋巴结 PD-1⁺ 及 PD-L1⁺ T 淋巴细胞比例比较

3 讨论

T 淋巴细胞是适应性免疫的主要组成部分, 其数量和促炎能力反映了适应性免疫系统状态。脓毒症时, T 淋巴细胞 IFN- γ 分泌受损, T 淋巴细胞凋亡增加、数量减少, 并高表达 PD-1 等抑制性表面分子^[8-9]。本研究显示, 与假手术组相比, CLP+DMSO 组小鼠 T 淋巴细胞比例下调、IFN- γ 分泌减少, 且 PD-1 表达显著增加, 提示 CLP 术后小鼠出现了明显的免疫抑制, 与既往文献报道一致^[8]。

近来研究提示, 表观遗传学修饰特别是组蛋白甲基化修饰广泛参与了脓毒症病理生理过程^[8, 10]。本课题组前期研究表明, 组蛋白甲基转移酶 EZH2 在脓症患者外周血中表达水平显著上升, 参与调控脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞极化, 并通过激活肺部 M1 型巨噬细胞介导了失控性炎症反应的发生^[7]。既往研究还提示, EZH2 是 T 淋巴细胞分化增殖及成熟的重要调控因子, 参与多种 T 淋巴细胞介导的免疫系统疾病的发生发展过程^[5, 11-12]。有文献报道, 使用 EZH2 抑制剂 3-DZNep 处理狼疮性肾病的小鼠模型可显著改善肾损伤、淋巴细胞浸润及炎症因子分泌^[13]。在一项多发性硬化的临床研究中发现, EZH2 在 T 淋巴细胞中表达水平显著增加^[14]。既往研究表明, 脓毒症小鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞中组蛋白 3 第 27 位赖氨酸的三甲基化(trimethylation of lysine 27 on histone 3, H3K27me3)显著增加, 且与 T 淋巴细胞的功能障碍显著相关^[15]。本课题组近期研究表明, EZH2 高表达于脓症患者外周血 T 淋巴细胞, 且与不良预后相关^[6], 但目前 EZH2 在小鼠脓毒症 T 淋巴细胞中的表达及研究尚鲜见报道。本研究显示, 尽管脓毒症小鼠外周血 T 淋巴细胞 EZH2 表达与假手

术组无显著差异,但小鼠肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞中 EZH2 表达较假手术组显著增加,提示 EZH2 可能参与调控脓毒症时 T 淋巴细胞的功能障碍。

为了探讨 EZH2 在脓毒症 T 淋巴细胞功能障碍中的调控作用,本研究中给予脓毒症小鼠 EZH2 选择性抑制剂 GSK126 进行干预,通过流式细胞仪检测观察到小鼠肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞数量回升,ki-67 的表达量显著增加;此外,CLP+GSK126 组小鼠肠系膜淋巴结 IFN- γ ⁺CD4⁺ 及 IFN- γ ⁺CD8⁺ 比例均较 CLP+DMSO 组显著提高,提示应用 GSK126 抑制 EZH2 表达可以改善脓毒症小鼠 T 淋巴细胞的功能障碍。

近来研究提示,PD-1/PD-L1 介导的信号通路在脓毒症 T 淋巴细胞功能障碍中具有重要作用^[16-17]。有文献报道,敲除或抑制 PD-1/PD-L1 通路可显著改善脓毒症小鼠的肺损伤^[18-19]。给予烧伤后继发铜绿假单胞菌感染的脓毒症小鼠抗 PD-L1 治疗后,引流淋巴结中 CD4⁺ 及 CD8⁺ 数量显著增加,CD8⁺ 细胞 IFN- γ 分泌增多^[20]。同时临床研究也证实,T 淋巴细胞的 PD-1 表达量是脓症患者预后的独立危险因素^[21]。因此,为探究 EZH2 如何调控脓毒症 T 淋巴细胞功能,本研究中检测了 PD-1 表达情况,发现给予脓毒症小鼠 EZH2 抑制剂 GSK126 干预后 PD-1 的表达显著降低。作为治疗脓毒症免疫抑制的潜在靶点,目前 PD-1 抑制剂纳武利尤单抗抗体已作为治疗脓毒症的新药进入临床试验阶段,目前尚未发现明显的药物不良反应^[22]。迄今为止,尚无针对脓毒症中 T 淋巴细胞表面 EZH2 表达与 PD-1 之间相互关系的研究,本课题组前期研究提示 EZH2 是治疗脓毒症免疫失调的潜在靶点,因此进一步研究 EZH2 与 PD-1 之间的关系可能有助于更全面地理解 PD-1 治疗脓毒症的机制,并为联合用药提供一定的理论依据。

综上所述,本研究结果提示,EZH2 参与了脓毒症 T 淋巴细胞功能障碍的发生发展过程,抑制 EZH2 可以改善脓毒症 T 淋巴细胞的增殖能力和炎症调节能力,这种 T 淋巴细胞功能的改善作用可能与调控 PD-1 的表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al. The

immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17 (7): 407-420. DOI: 10.1038/nri.2017.36.

[3] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (12): 862-874. DOI: 10.1038/nri3552.

[4] Fioravanti R, Stazi G, Zwergel C, et al. Six years (2012-2018) of researches on catalytic EZH2 inhibitors: the boom of the 2-pyridone compounds [J]. *Chem Rec*, 2018, 18 (12): 1818-1832. DOI: 10.1002/ctcr.201800091.

[5] Zhang YX, Kinkel S, Maksimovic J, et al. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells [J]. *Blood*, 2014, 124 (5): 737-749. DOI: 10.1182/blood-2013-12-544106.

[6] Zhao DY, Li Z, Liu XD, et al. Lymphocyte expression of EZH2 is associated with mortality and secondary infectious complications in sepsis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89 (Pt B): 107042. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107042.

[7] Zhang QQ, Sun H, Zhuang SG, et al. Novel pharmacological inhibition of EZH2 attenuates septic shock by altering innate inflammatory responses to sepsis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105899. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105899.

[8] Danahy DB, Strother RK, Badovinac VP, et al. Clinical and experimental sepsis impairs CD8 T-cell-mediated immunity [J]. *Crit Rev Immunol*, 2016, 36 (1): 57-74. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.2016017098.

[9] Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, et al. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96 (5): 767-777. DOI: 10.1189/jlb.5MR0114-067R.

[10] 张笑婷, 纪文焘, 薄禄龙, 等. 脓毒症基础研究的进展及未来方向 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (8): 919-921. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210126-00132.

[11] Carson WF, Cavassani KA, Dou YL, et al. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression [J]. *Epigenetics*, 2011, 6 (3): 273-283. DOI: 10.4161/epi.6.3.14017.

[12] Huang QR, He S, Tian YY, et al. Hsp90 inhibition destabilizes Ezh2 protein in alloreactive T cells and reduces graft-versus-host disease in mice [J]. *Blood*, 2017, 129 (20): 2737-2748. DOI: 10.1182/blood-2016-08-735886.

[13] Rohraff DM, He Y, Farkash EA, et al. Inhibition of EZH2 ameliorates lupus-like disease in MRL/lpr mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71 (10): 1681-1690. DOI: 10.1002/art.40931.

[14] Malhotra S, Villar LM, Costa C, et al. Circulating EZH2-positive T cells are decreased in multiple sclerosis patients [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1): 296. DOI: 10.1186/s12974-018-1336-9.

[15] Carson WF 4th, Cavassani KA, Ito T, et al. Impaired CD4⁺ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40 (4): 998-1010. DOI: 10.1002/eji.200939739.

[16] 徐畅, 李莉, 严静. 程序性死亡受体-1 信号通路在脓毒症中作用的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (9): 1160-1162. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.09.021.

[17] Zhang Y, Zhou Y, Lou JS, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (6): R220. DOI: 10.1186/cc9354.

[18] Nakamori Y, Park EJ, Shimaoka M. Immune deregulation in sepsis and septic shock: reversing immune paralysis by targeting PD-1/PD-L1 pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 624279. DOI: 10.3389/fimmu.2020.624279.

[19] 包晓玮, 孙宏, 杨倩, 等. 共刺激分子程序性死亡配体-1 在急性肺损伤中的作用及机制初探 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (6): 498-503. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.06.005.

[20] Patil NK, Luan LM, Bohannon JK, et al. Frontline science: anti-PD-L1 protects against infection with common bacterial pathogens after burn injury [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103 (1): 23-33. DOI: 10.1002/JLB.5HI0917-360R.

[21] 王宗培, 谢智慧, 赵玉洁, 等. 共刺激分子程序性细胞死亡受体-1/程序性细胞死亡受体配体-1 调控树突状细胞对脓症患者免疫功能的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (9): 1032-1039. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210419-00572.

[22] Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, et al. Immune checkpoint inhibition in sepsis: a phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab [J]. *Intensive Care Med*, 2019, 45 (10): 1360-1371. DOI: 10.1007/s00134-019-05704-z.