

脓毒症患者循环外泌体对 T 细胞功能的影响

黄俊鸿^{1,2} 黄国戈² 张春梅² 蹇孟玲² 李欣² 江稳强^{1,2}

¹华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006; ²南方医科大学附属广东省人民医院 (广东省医学科学院) 急诊科急诊重症监护室, 广东广州 510080

通信作者: 江稳强, Email: jiangwenqiang@gdph.org.cn

【摘要】 目的 探讨脓毒症患者循环外泌体(EXO)对T细胞功能的影响。方法 用超速离心法获取南方医科大学附属广东省人民医院急诊重症监护室收治的10例脓毒症患者血浆EXO后,利用透射电镜观察、纳米粒子跟踪分析(NTA)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测EXO标志物鉴定EXO的特征。从5名健康志愿者外周血中分离出外周血单个核细胞(PBMC),使用磁珠分选原代T细胞并体外扩增。用不同剂量(0、1、2.5、5、10 mg/L)脓毒症患者循环EXO干预T细胞24 h后,使用细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK-8)检测T细胞活性,流式细胞术检测T细胞活化指标CD69和CD25的表达,进一步评估CD4⁺T细胞程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)表达和调节性T细胞(Treg)比例等免疫抑制指标。结果 鉴定结果证实成功从脓毒症患者血浆中提取出EXO,脓毒症患者循环EXO含量明显高于健康对照组(mg/L: 48.78±5.14比22.18±2.25, $P<0.01$)。5 mg/L脓毒症患者血浆EXO干预原代T细胞24 h后, T细胞活性开始出现抑制[(85.84±0.56)%比(100.00±0.00)%, $P<0.05$];随着剂量增加,10 mg/L EXO干预T细胞24 h后,细胞活性被明显抑制[(72.44±2.36)%比(100.00±0.00)%, $P<0.01$]。与健康对照组相比,脓毒症患者血浆EXO干预T细胞后,早期活化指标CD69表达显著减少[(52.87±1.29)%比(67.13±3.56)%, $P<0.05$],同时伴随着T细胞中PD-1表达上调[(57.73±3.06)%比(32.07±0.22)%, $P<0.01$]和Treg比例增加[(54.67±1.19)%比(24.60±3.51)%, $P<0.01$],但晚期活化指标CD25表达保持稳定[(84.77±3.44)%比(85.93±2.32)%, $P>0.05$]。结论 脓毒症患者循环EXO引起T细胞功能障碍,其可能是导致脓毒症免疫抑制的新机制。

【关键词】 脓毒症; 免疫抑制; T细胞; 外泌体

基金项目: 广东省自然科学基金(2022A1515012428)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230228-00122

Effect of circulating exosomes in patients with sepsis on T cell function

Huang Junhong^{1,2}, Huang Guo², Zhang Chunmei², Jian Mengling², Li Xin², Jiang Wenqiang^{1,2}

¹School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China; ²Emergency Intensive Care Unit, Department of Emergency, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: Jiang Wenqiang, Email: jiangwenqiang@gdph.org.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of circulating exosomes (EXO) on T cell function in patients with sepsis. **Methods** Plasma EXO were obtained by ultracentrifugation from 10 patients with sepsis admitted to the emergency intensive care unit of Guangdong Provincial People's Hospital Affiliated to Southern Medical University. Transmission electron microscopy observation, nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blotting were used to detect EXO markers to identify their characteristics. Furthermore, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the peripheral blood of 5 healthy volunteers, primary T cells were sorted by magnetic beads and expanded *in vitro*. After 24 hours of intervention with different doses (0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L) of circulating EXO in patients with sepsis, T-cell activity was assessed using a cell counting kit-8 (CCK-8). The expression of T cell activation indicators CD69 and CD25 were observed using flow cytometry. Additional evaluations were performed on immunosuppressive indicators including the expression of programmed cell death 1 (PD-1) in CD4⁺ T cells and the proportion of regulatory T cell (Treg). **Results** The identification results confirmed that the successful isolation of EXO from the plasma of sepsis patients. The expression level of circulating EXO in sepsis patients was higher than that in healthy control group (mg/L: 48.78±5.14 vs. 22.18±2.25, $P<0.01$). After 24 hours of intervention with 5 mg/L of plasma EXO from sepsis patients, T cells activity began to show suppression [(85.84±0.56)% vs. (100.00±0.00)%, $P<0.05$]. As the dosage increased, after 24 hours of intervention with 10 mg/L of EXO, T cells activity was significantly suppressed [(72.44±2.36)% vs. (100.00±0.00)%, $P<0.01$]. Compared with the healthy control group, after T cells intervention with plasma EXO from sepsis patients, the expression of early activation marker CD69 was significantly reduced [(52.87±1.29)% vs. (67.13±3.56)%, $P<0.05$]. Meanwhile, there was an upregulation of PD-1 expression in T cells [(57.73±3.06)% vs. (32.07±0.22)%, $P<0.01$] and an increase in the proportion of Treg [(54.67±1.19)% vs. (24.60±3.51)%, $P<0.01$]. However, the expression of the late activation marker CD25 remained stable [(84.77±3.44)% vs. (85.93±2.32)%, $P>0.05$]. **Conclusion** Circulating EXO in sepsis patients induce T cell dysfunction, which may be a novel mechanism lead to immunosuppression in sepsis.

【Key words】 Sepsis; Immunosuppression; T lymphocytes; Exosomes

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515012428)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230228-00122

脓毒症是一种由机体对感染反应失调引起的器官功能障碍,有报道约 50% 的脓毒症住院患者需要入住重症监护病房(intensive care unit, ICU),占 ICU 住院患者的 10%。脓毒症随时间变化引发复杂的免疫反应,主要表现为促炎与抗炎反应失衡^[1],是 ICU 患者死亡的主要原因^[2-3]。近期研究显示,高炎症反应后的免疫抑制是导致机体继发性感染和脓毒症患者预后不良的重要因素^[4]。T 细胞稳态是维持宿主免疫系统运作和抵御后续感染的重要环节,而 T 细胞功能障碍是脓毒症免疫抑制的重要机制,表现为 T 细胞的异常活化,表型和功能变化^[5]。

外泌体(exosomes, EXO)是具有脂质双层结构的纳米级细胞外囊泡,可以在各种细胞中转运物质,并在通讯和递质中发挥关键作用^[6]。由于 EXO 在血浆等体液中的含量具有差异,故已被报道作为癌症发展和自身免疫性疾病的生物标志物^[7-8]。血浆 EXO 可以在细胞间进行局部和系统的交流,扩展其起源细胞的功能库,并促进一系列生物学过程^[9]。然而,血浆 EXO 在脓毒症免疫抑制进展中的作用鲜有报道,有研究提示脓毒症循环 EXO 可能参与免疫调控,与 T 细胞增殖分化有关^[10],但具体机制不明,其是否影响 T 细胞活化以及共抑制性免疫检查点表达等其他免疫功能尚不清楚。因此,本研究旨在评估脓毒症患者循环 EXO 含量变化,探讨脓毒症循环 EXO 刺激下 T 细胞功能的变化。

1 材料与方法

1.1 临床样本:临床血浆样本来源于南方医科大学附属广东省人民医院急诊重症监护室收治的 10 例脓毒症确诊患者,其符合 Sepsis-3 诊断标准^[11],另选取 5 名健康对照者外周血分选 T 细胞。本研究方案经南方医科大学附属广东省人民医院伦理委员会同意批准(伦理号:KY-H-2021-066-02),并与所有的研究对象签署知情同意书。

1.2 主要试剂:355618 超速离心管购自美国贝克曼库尔特公司;人外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司;人 T 细胞分选试剂盒和分选磁极以及 CD3、CD28 抗体购自美国 BioLegend 公司;无血清培养基 KBM581 购自美国康宁公司;RPMI1640 培养基、青霉素-链霉素溶液、杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco phosphate buffered saline, DPBS)购自美国赛默飞世

尔公司;白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)重组蛋白购自美国 MedChemExpress 公司;别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)-花青素 7(Cyanine 7, Cy7)-CD3、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)-CD127、APC-CD69、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death 1, PD-1)、PE-Cy5.5-CD4、PE-Cy7-CD25 流式抗体均购自美国碧迪医疗公司;细胞增殖与毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本东仁化学公司;EXO 标志物抗体[钙连蛋白 Calnexin、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)]购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔/鼠二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 T 细胞培养:用 Ficoll 密度梯度离心法提取健康者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),按照试剂盒说明进行 T 细胞分选。将 CD3(5 mg/L)抗体包被到 24 孔板,37 °C 孵育 2 h。去除抗 CD3 并用 DPBS 洗涤 2 次后,在 KBM581 培养基中添加抗 CD28(5 mg/L)和 IL-2(100 kU/L),将 T 细胞以 $1 \times 10^6/L$ 种板,37 °C 孵育 48 ~ 72 h。分别在铺板 24 h 和 48 h 观察细胞生长和单克隆形成。

1.4 超速离心法获取循环 EXO:将采集的脓毒症患者新鲜血液置于乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝管中,离心 5 min 收集血浆^[12];室温下离心 10 min 以去除残留的细胞和碎片;将上清液转移到新管中并在室温下离心 30 min,将所得的上清液再次转移到新管中离心 70 min。此步骤获得的粗 EXO 颗粒含有少量杂蛋白,用巴氏管小心吸出上清液。用 6 mL DPBS 缓冲液重悬 EXO 沉淀并离心,最后用 DPBS 缓冲液重悬 EXO 颗粒以获得纯 EXO。

1.5 EXO 的表征鉴定:分离出的 EXO 颗粒用 2% 多聚甲醛固定,并加载到 formvar 碳涂层网格上,孵育 15 min 后用乙酸双氧铀负染色 5 min,透射电镜下观察。分离的 EXO 在 DPBS 中稀释 1 000 倍,并通过纳米粒子跟踪分析仪 Zeta View 进行测量。通过纳米粒子跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)系统分析 EXO 的大小分布和总数。收集 EXO

并进行裂解,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法检测蛋白浓度,蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 EXO 标志物,经聚丙烯酰胺蛋白电泳,使用湿转法将蛋白转移至 0.22 μm 的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,牛奶常温封闭 60 min,加 EXO 标志物一抗 4 ℃ 孵育过夜,室温条件下孵育二抗(1:5 000)1 h,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤 3 次,用电化学发光试剂进行显影。

1.6 T 细胞摄取 EXO: 将 T 细胞接种在多聚赖氨酸和 CD3 包被的培养皿中并活化增殖 12 h,然后将 EXO 与 100 μL 的稀释剂 C 混合,将 PKH67 染料添加到混合物中室温下避光孵育;染色后,加入 400 μL 0.5% 牛血清白蛋白以结合多余的 PKH67 染料,然后将标记的 EXO 在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中稀释并通过超速离心沉淀;将标记的 EXO 添加到 T 细胞培养物中孵育 3~6 h,进行免疫荧光染色。

1.7 CCK-8 检测细胞活性: 准备细胞悬浮液并计数细胞,将细胞接种到 96 孔板中,每孔中加细胞悬液 100 μL,细胞密度为每孔 2×10^4 个,每个样品重复 4~6 次以确保准确性。将脓毒症患者和健康者 EXO 加入到孔板中继续培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,4 h 后在波长 450 nm 处测定吸光度(A)值。

1.8 流式细胞术检测 T 细胞表面活性标志物 PD-1 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的比例: EXO 干预 24 h 后,收集 T 细胞用 PBS 洗涤,重悬于 100 μL PBS 中,加入亮染缓冲液、CD25-PE-Cy7、CD3-APC-Cy7、CD127-PE、CD69-APC、PD-1-FITC、CD4-PE-Cy5.5 抗体避光孵育 30 min;在 200 μL 的 PBS 中重悬细胞,并使用流式细胞仪分析标志物的表达。

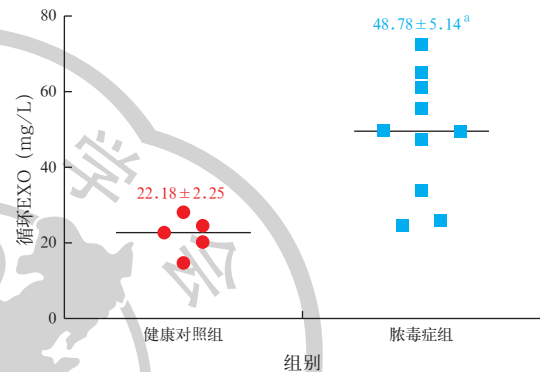
1.9 统计学处理: 应用 GraphPad Prism 8 软件分析数据。正态分布的计量资料以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症患者循环 EXO 鉴定(图 1): 为确认血浆 EXO 的成功提取,对通过超速离心从脓毒症患者外周血浆分离的 EXO 分别进行电镜观察、NTA 和 EXO 标志物 Western blotting 检测。首先,

在电镜下直接观察 EXO 的大小和结构,清晰可见典型的杯状结构。然后,NTA 结果显示,主峰直径分布在 150 nm 左右,EXO 大小范围为 30~200 nm。此外,Western blotting 分析显示,以 293T 细胞裂解物(cell lysate, CL)作为阳性对照,EXO 样品表达了阳性蛋白标志物 TSG101 和 HSP70,而不表达阴性标志物 Calnexin。

2.2 脓毒症患者循环 EXO 含量(图 2): 脓毒症患者循环 EXO 含量较健康者更高($P < 0.01$)。



注: EXO 为外泌体;与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$

图 2 脓毒症患者与健康对照者循环 EXO 含量比较

2.3 循环 EXO 作用于 T 细胞及其对活性的影响(图 3~4): 使用 Ficoll 密度梯度离心法从健康对照者的外周血中分离出 PBMC,然后通过磁珠分选进一步纯化 T 细胞,并通过 CD3 抗体包被板、CD28 抗体和 IL-2 刺激 48 h 实现活化增殖,磁珠分选效率 > 90%,满足实验要求。显微镜下观察发现 T 细胞增殖形成较多单克隆,适用于下游实验。荧光显微镜下观察显示,PKH67 标记的 EXO 在 T 细胞胞质内定位。用不同剂量脓毒症患者循环 EXO 刺激 T 细胞增殖 24 h 发现,随着 EXO 浓度的增加,在 5 mg/L 和 10 mg/L EXO 刺激下 T 细胞增殖受到显著抑制(均 $P < 0.05$)。

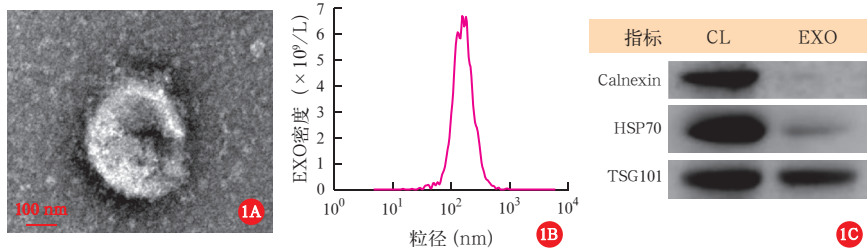
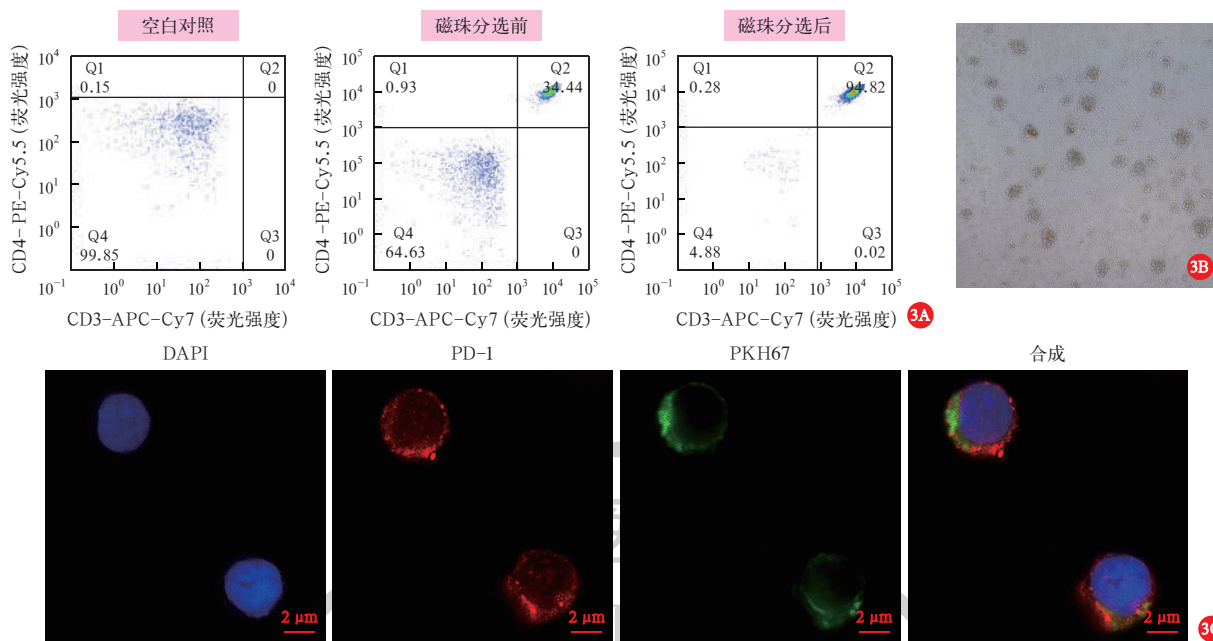
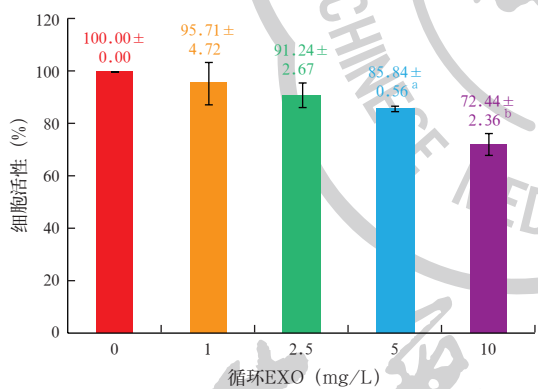


图 1 脓毒症患者循环外泌体(EXO)鉴定 A 为透射电镜下观察循环 EXO 呈典型的杯状结构,高倍放大; B 为纳米粒子跟踪分析(NTA)显示循环 EXO 的中位粒径为 154.9 nm,粒径主峰为 158.7 nm,粒径主峰下 EXO 密度为 $7 \times 10^9/L$ (总原始密度为 $6.9 \times 10^{14}/L$); C 为蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)显示 EXO 阳性标志物热休克蛋白 70(HSP70)、肿瘤易感基因 101(TSG101)表达,但不表达阴性标志物钙连蛋白 Calnexin,CL 为 293T 细胞裂解物



注: A 为磁珠分选 T 细胞效率, 未加抗体空白对照阳性细胞为 0%, 分选前样本阳性细胞占 34.44%, 分选后样本阳性细胞占 94.82%, APC 为别藻蓝蛋白, Cy7 为花青素 7, PE 为藻红蛋白, Cy5.5 为花青素 5.5; B 为显微镜下观察 T 细胞在体外活化增殖 48 h 后形成单克隆集落, 白光拍摄, 低倍放大; C 为荧光显微镜下观察 T 细胞对 PKH67 染料标记的循环 EXO 内化, 4', 6-二脒基-2-苯基咪唑 (DAPI) 标记的细胞核呈蓝色荧光, 程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 标记的 T 细胞呈红色荧光, PKH67 标记的 EXO 呈绿色荧光, EXO 干预 24 h 后 T 细胞表面附着 EXO, 免疫荧光染色, 高倍放大

图 3 体外 T 细胞对循环外泌体 (EXO) 的成功获取

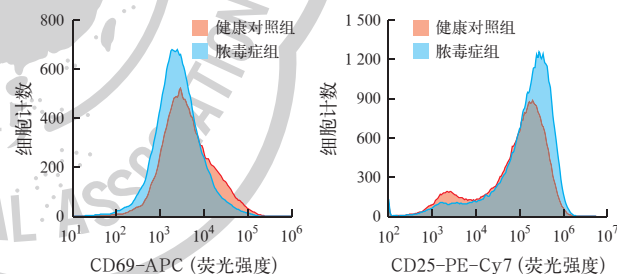


注: 与 0 mg/L EXO 比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 4 不同剂量脓毒症患者循环外泌体 (EXO) 刺激后 T 细胞 24 h 后细胞活性变化

2.4 循环 EXO 影响 T 细胞活化 (图 5; 表 1): 用流式细胞术分析 T 细胞表面 CD69 和 CD25 的表达以评估细胞活化情况。与健康对照组比较, 脓毒症组患者循环 EXO 刺激 24 h 后, T 细胞上早期活化标志物 CD69 表达显著降低 ($P < 0.05$), 而晚期活化标志物 CD25, 表达保持稳定。

2.5 循环 EXO 对 T 细胞 PD-1 表达及 Treg 占比的影响 (表 1; 图 6): 与健康对照组相比, 脓毒症组患者循环 EXO 刺激 24 h 后, CD4⁺ T 细胞的 PD-1 表达显著增加, Treg 在 CD4⁺ T 细胞中的比例明显上调 (均 $P < 0.01$)。



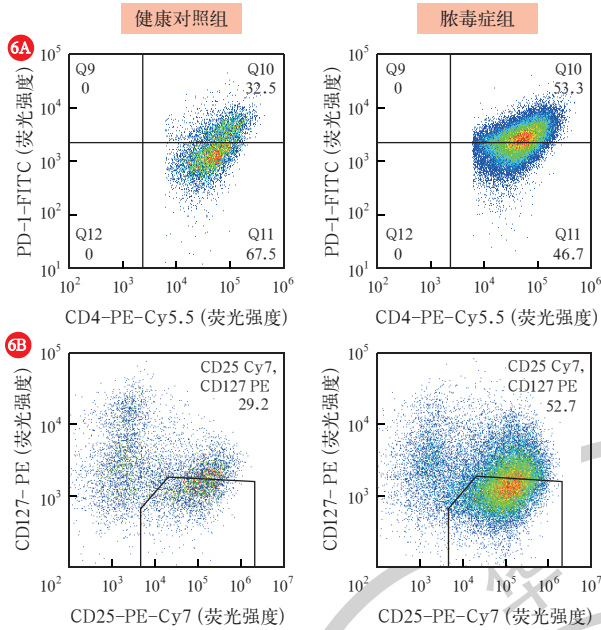
注: CD69 为早期活化指标, APC 为别藻蓝蛋白, CD25 为晚期活化指标, PE 为藻红蛋白, Cy7 为花青素 7

图 5 流式细胞术分析健康对照者和脓毒症患者循环外泌体 (EXO) 刺激的 T 细胞活化情况

表 1 健康对照者与脓毒症组患者血浆 EXO 干预后 T 细胞表面活化标志物表达、PD-1 表达及 Treg 比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (例)	CD4 ⁺ CD69 ⁺ (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)
健康对照组	5	67.13 ± 3.56	85.93 ± 2.32
脓毒症组	10	52.87 ± 1.29	84.77 ± 3.44
<i>t</i> 值		3.768	0.281
<i>P</i> 值		0.020	0.782
组别	样本数 (例)	PD-1 (%)	Treg 比例 (%)
健康对照组	5	32.07 ± 0.22	24.60 ± 3.51
脓毒症组	10	57.73 ± 3.06	54.67 ± 1.19
<i>t</i> 值		8.371	8.108
<i>P</i> 值		0.001	0.001

注: EXO 为外泌体, CD69 为早期活化指标, CD25 为晚期活化标志物, PD-1 为程序性细胞死亡蛋白 1, Treg 为辅助性 T 细胞



注：A 为 CD4⁺T 细胞程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 表达阳性率，PE 为藻红蛋白，Cy5.5 为花青素 5.5，FITC 为异硫氰酸荧光素；B 为 CD4⁺T 细胞中 Treg 占比，Cy7 为花青素 7

图 6 流式细胞术检测健康对照者和脓毒症患者循环外泌体 (EXO) 刺激 24 h 后 CD4⁺T 细胞中 PD-1 表达以及 Treg 占比情况

3 讨论

随着我们对免疫细胞受体及其配体和信号通路的深入研究与了解,已经发掘了各种生物标志物来识别预测脓毒症诱导的免疫功能障碍^[13]。最近有关脓毒症循环 EXO 标志物的研究取得了一些进展,创伤患者血浆 EXO 均对骨髓功能产生不利影响^[14]。血浆 EXO 氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 水平升高与脓症患者急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 的严重程度和病死率相关^[15]。在脓毒症中,循环 EXO 的释放可能参与了免疫反应的调节,但具体的作用机制尚不清楚。本研究成功提取了脓症患者循环 EXO,并探索了循环 EXO 刺激 T 细胞后 T 细胞活性、细胞活化、免疫抑制受体表达和活化以及细胞亚群占比的变化,结果显示,脓症患者循环 EXO 含量较健康对照者明显增加,且循环 EXO 影响 T 细胞活性并下调 T 细胞活化,上调 CD4⁺T 细胞 PD-1 表达并增加 Treg 细胞比例。

有研究报道,脓症患者血浆 EXO 总体水平与器官衰竭和病死率有关^[16],EXO 标志物 CD63 水平升高与器官衰竭的严重程度有关^[17],并能预测危重脓毒症患者的病死率,但泛 EXO 标志物 CD9/CD63 特指总体 EXO 表达量存在片面。本研究中采用超速离心法提取循环 EXO,初步证实脓症患者循环 EXO 含量较健康对照者明显增加。现有研究表

明,脓症患者循环 EXO 含量升高的同时其内容物表达水平也在发生改变。Gao 等^[18]研究显示,脓症患者 EXO 的微小 RNA-1-3p (microRNA-1-3p, miR-1-3p) 表达显著增加诱导内皮细胞功能障碍。Li 等^[19]通过 EXO 蛋白组质谱及 RNA 测序等手段对脓症患者血清 EXO 进行综合多组学分析,发现 354 种蛋白质、195 种 mRNA 和 55 种 miRNA 的差异表达,表明脓症患者血清 EXO 与细胞因子的合成分泌密切相关。这也充分说明 EXO 含有许多成分,在脓毒症期间执行各种生物学功能。

在脓毒症疾病状态下,循环 EXO 源于哪些器官细胞? 有研究报道,血小板来源的 EXO 促进脓毒症伴随器官损伤中中性粒细胞细胞外陷阱过度形成,活化的血小板释放的 EXO 相关信号是脓毒性休克的关键特征^[20]。有学者通过 EXO RNA 测序在组织和细胞水平上调查尿 EXO 的起源,发现尿 EXO 主要由膀胱组织分泌^[21]。通过高通量测序技术对循环 EXO 进行深入挖掘,这些研究都为循环 EXO 在脓毒症中的应用提供了参考,循环 EXO 作为脓毒症诊断和预后预测的生物标志物的临床价值有待进一步研究。

先前的研究表明,脓毒症小鼠的血清 EXO 可诱导脾脏 T 淋巴细胞辅助性 T 细胞 1 (helper T cell 1, Th1) 表型向 Th2 分化并增加细胞增殖和迁移^[10]。脓症患者血浆的 EXO 可通过 miR-7-5p 下调不良物质来抑制 T 淋巴细胞的凋亡^[22]。现有研究未涉及更多脓症患者循环 EXO 对 T 细胞功能以及免疫指标的讨论,本研究从干预人的外周血原代 T 细胞出发,侧重关注循环 EXO 对原代 T 细胞的活化、活性以及免疫抑制相关指标。结果显示,脓症患者血浆 EXO 在体外能抑制 T 细胞活性, T 细胞的早期活化指标 CD69 表达也明显下降。先前研究表明,在脓毒症期间, T 细胞在前 24 h 内表达活化标志物 CD69,脓毒症早期 T 细胞的完全活化需要特异性抗原^[23]。本研究表明,脓毒症循环 EXO 可能具有强烈抑制 T 细胞活化的作用。

EXO 的释放代表了一种即时的细胞通讯机制,它以旁分泌的方式改变邻近细胞的表型,也通过膜结构传递基质到机体的其他区域^[24]。本研究证实,循环 EXO 被 T 细胞摄取,循环 EXO 还可以刺激 T 细胞表面免疫抑制受体 PD-1 的表达升高并扩大 Treg 比例。这表明循环 EXO 作为细胞间通讯模式并具有抑制 T 细胞功能的潜力。而 PD-1 作为一种

关键的免疫抑制性检查点,其作用是抑制由 T 细胞受体引发的活化信号^[25]。T 细胞免疫功能障碍的其中一种机制是 PD-1 在 T 细胞表面的高表达,这可能导致其丧失效应功能^[26-27]。进一步研究结果表明,脓毒性休克患者 Treg 细胞比例增加,作为一种抑制性免疫细胞,提示其与循环 EXO 的免疫抑制作用密切相关^[28-29],说明循环 EXO 是脓毒症 T 细胞功能障碍和免疫抑制的重要因素,但与脓症患者预后之间的关系如何,是什么物质介导了循环 EXO 引起的 T 细胞功能障碍与免疫抑制也尚未阐明。先前研究报道,肿瘤循环 EXO 可通过其表面细胞程序性死亡配体 1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)与 T 细胞表面 PD-1 结合,发挥 PD-1/PD-L1 轴类似的细胞间通讯作用^[30],在脓症患者中是否存在同样的免疫调控机制值得进一步研究。

综上所述,循环 EXO 可能通过多种途径影响 T 细胞的免疫功能,本研究初步验证了脓症患者循环 EXO 对 T 细胞功能的影响,其可能通过影响 T 细胞活性、抑制 T 细胞激活也上调免疫检查点 PD-1 和 Treg 比例。深入研究循环 EXO 与 T 细胞功能的关系,有望为疾病的治疗和预防提供新的思路与方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39 (5): 517-528. DOI: 10.1007/s00281-017-0639-8.
- [2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10219): 200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- [3] Fleischmann-Struzek C, Mellhhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46 (8): 1552-1562. DOI: 10.1007/s00134-020-06151-x.
- [4] 何雪梅, 薄禄龙, 姜春玲. 脓毒症免疫抑制与免疫刺激治疗的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (12): 1202-1205. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.12.020.
- [5] 张文钊, 王志斌. 脓毒症免疫抑制相关效应 T 细胞亚群稳态失衡的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (1): 95-99. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210610-00858.
- [6] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (6): 654-659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- [7] Luo CB, Xin HY, Zhou ZJ, et al. Tumor-derived exosomes induce immunosuppressive macrophages to foster intrahepatic cholangiocarcinoma progression [J]. *Hepatology*, 2022, 76 (4): 982-999. DOI: 10.1002/hep.32387.
- [8] Wu LF, Zhang Q, Mo XB, et al. Identification of novel rheumatoid arthritis-associated MiRNA-204-5p from plasma exosomes [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54 (3): 334-345. DOI: 10.1038/s12276-022-00751-x.
- [9] Keller MD, Ching KL, Liang FX, et al. Decoy exosomes provide protection against bacterial toxins [J]. *Nature*, 2020, 579 (7798): 260-264. DOI: 10.1038/s41586-020-2066-6.

- [10] Gao K, Jin JM, Huang CY, et al. Exosomes derived from septic mouse serum modulate immune responses via exosome-associated cytokines [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1560. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01560.
- [11] 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.
- [12] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [13] 肖飞, 王银, 林海煊, 等. 糖化血清蛋白联合血糖变异度对老年脓症患者继发持续性炎症-免疫抑制-分解代谢综合征的预测价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (11): 1051-1055. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.11.008.
- [14] 管鹏飞, 崔瑞文, 王其友, 等. 负载骨髓干细胞来源外泌体的 3D 水凝胶通过调节免疫促进损伤软骨的修复 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42 (4): 528-537. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.04.08.
- [15] Gong T, Zhang XD, Peng ZY, et al. Macrophage-derived exosomal aminopeptidase N aggravates sepsis-induced acute lung injury by regulating necroptosis of lung epithelial cell [J]. *Commun Biol*, 2022, 5 (1): 543. DOI: 10.1038/s42003-022-03481-y.
- [16] Im Y, Yoo H, Lee JY, et al. Association of plasma exosomes with severity of organ failure and mortality in patients with sepsis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (16): 9439-9445. DOI: 10.1111/jcmm.15606.
- [17] Im Y, Yoo H, Ko RE, et al. Exosomal CD63 in critically ill patients with sepsis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 20300. DOI: 10.1038/s41598-021-99777-w.
- [18] Gao M, Yu TY, Liu D, et al. Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1 [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135 (2): 347-365. DOI: 10.1042/CS20200573.
- [19] Li L, Huang L, Huang CY, et al. The multiomics landscape of serum exosomes during the development of sepsis [J]. *J Adv Res*, 2022, 39: 203-223. DOI: 10.1016/j.jare.2021.11.005.
- [20] Jiao Y, Li WW, Wang W, et al. Platelet-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock [J]. *Crit Care*, 2020, 24 (1): 380. DOI: 10.1186/s13054-020-03082-3.
- [21] Zhu Q, Cheng L, Deng C, et al. The genetic source tracking of human urinary exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118 (43): e2108876118. DOI: 10.1073/pnas.2108876118.
- [22] Deng JN, Li YQ, Liu Y, et al. Exosomes derived from plasma of septic patients inhibit apoptosis of T lymphocytes by down-regulating bad via hsa-miR-7-5p [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513 (4): 958-966. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.051.
- [23] Schmoekel K, Traffehn S, Eger C, et al. Full activation of CD4⁺ T cells early during sepsis requires specific antigen [J]. *Shock*, 2015, 43 (2): 192-200. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000267.
- [24] 刘宁, 齐保玉, 孙传睿, 等. 不同干细胞来源的外泌体促进血管形成的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39 (1): 170-177. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2023.01.020.
- [25] Shankar-Hari M, Fish M, Azoulay E. Should we consider blocking the inhibitory immune checkpoint molecules for treating T cell exhaustion in sepsis? [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46 (1): 119-121. DOI: 10.1007/s00134-019-05814-8.
- [26] 邹晗, 钱何步, 赵宏胜. 胸腺肽联合生脉注射液对免疫功能低下脓症患者细胞免疫功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (2): 136-140. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.003.
- [27] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15 (8): 486-499. DOI: 10.1038/nri3862.
- [28] Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients [J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35 (4): 678-686. DOI: 10.1007/s00134-008-1337-8.
- [29] Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-β decreases the percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival [J]. *Surgery*, 2012, 151 (2): 313-322. DOI: 10.1016/j.surg.2011.07.019.
- [30] Chen G, Huang AC, Zhang W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response [J]. *Nature*, 2018, 560 (7718): 382-386. DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8.

(收稿日期: 2023-02-28)