

ILT4 促进脓毒症炎症反应并介导免疫麻痹

章德文 丁娴 刘树雄 夏新宇 朱守朝 何建

【摘要】目的 探讨脓毒症外周血单核细胞表达 ILT4 (免疫球蛋白样转录物 4) 的生物行为及效应, 以及对预后的影响。**方法** 选取 BALB/c ILT4 +/+ (WT)、BALB/c ILT4 雄性小鼠, CLP 复制脓毒症模型。用流式细胞仪定量检测 CLP 术后 24 h 外周血单核细胞 ILT4、MHC-II 表达水平; 用 ELISA 法检测各组 0、6、12、24 h 血清 IL-6、TNF- α 浓度; 并观察 168 h 内生存预后。**结果** CLP 术后 24 h 脓毒症小鼠外周血单核细胞高度表达 ILT4 分子 [(1 292.00 \pm 143.70) vs. (193.50 \pm 52.54), $P < 0.05$]; 较 WT 组 ILT4-/- 小鼠外周血单核细胞表达 MHC-II 比率明显增高 [(49.38 \pm 5.66)% vs. (24.25 \pm 6.76)%, $P < 0.05$]。CLP 术后 24 h 血清 IL-6 显著增高 [(470.75 \pm 88.03) vs. (54.25 \pm 20.04), $P < 0.05$], ILT4 敲除后很大程度的抑制这一趋势 [(241.25 \pm 45.10) vs. (470.75 \pm 88.03), $P < 0.05$]; 但对 TNF- α 表达无显著性干扰 [(50.88 \pm 6.38) vs. (53.13 \pm 5.49), $P > 0.05$]。且 ILT4-/- 小鼠 CLP 术后生存率较 WT 明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 脓毒症时外周血单核细胞高表达 ILT4, 与血清 IL-6 高水平及单核细胞 MHC-II 低表达率相关, 导致病死率增加。

【关键词】 脓毒症; 单核细胞 ILT4; CD85; MHC-II; IL-6; TNF- α ; 免疫麻痹; 盲肠结扎穿孔术

Immunoglobulin-like transcript-4 (ILT4) expression in mononuclear cells on the prognosis of sepsis

Zhang Dewen, Ding Xian, Liu Shuxiong, Xia Xinyu, Zhu Shouchao, He Jian
Emergency Department, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 201805, Chian
Corresponding author: He Jian, Email: hejiansmmu@126.com

【Abstract】 Objective To study the biological behaviors and effects of immunoglobulin-like transcript-4 (ILT4) expression in mononuclear cells on the prognosis of sepsis. **Methods** ILT4 +/+ (WT) and ILT4-knockout mice (ILT4-/-) male BALB/c mice were used for sepsis modeling using cecal ligation puncture (CLP). Flow cytometry was used to measure the levels of expression of ILT4 and major histocompatibility complex class II molecules (MHC-II) in mononuclear cells of peripheral blood 24 h after CLP. ELISA was used to measure the concentrations of interleukin-6 (IL-6) and serum tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in different groups of mice at 0 h, 6 h, 12 h, and 24 h after CLP to monitor the survival and prognosis over the course of 168 h. **Results** ILT4 was highly expressed in mononuclear cells of the peripheral blood of septic mice 24 h after CLP in comparison with that before CLP (1292.00 \pm 143.70) vs. (193.50 \pm 52.54), $P < 0.05$. MHC-II expression in mononuclear cells of the peripheral blood in ILT4-/- mice was significantly higher than that in WT mice (49.38 \pm 5.66)% vs. (24.25 \pm 6.76)%, $P < 0.05$. Serum IL-6 was significantly elevated 24 h after CLP compared with that before CLP (470.75 \pm 88.03) vs. (54.25 \pm 20.04), $P < 0.05$. The serum IL-6 concentration was much lower in ILT4-/- mice than that in WT mice (241.25 \pm 45.10) vs. (470.75 \pm 88.03), $P < 0.05$; whereas, there was no significant difference in TNF- α expression between two groups of mice (50.88 \pm 6.38) vs. (53.13 \pm 5.49), $P > 0.05$. The survival rate of ILT4-/- mice was significantly higher after CLP compared with WT mice ($P < 0.05$). **Conclusion** The high level of ILT4 expression in mononuclear cells were observed in peripheral blood during sepsis and it was found to be associated with high serum IL-6 levels and low MHC-II expression in mononuclear cells, leading to increased mortality.

【Key words】 Sepsis; Monocyte; Immunoglobulin-like transcript-4 (ILT4); CD85; Major histocompatibility complex class II molecules (MHC-II); Interleukin (IL) -6; Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α); Immunologic paralysis; Cecal ligation puncture

脓毒症 (sepsis) 是机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍^[1]。20 年来, 虽然对其发病机制与临床规律的研究取得长足进步^[2], 但其病死率依然居高不下。国内有研究报道外科 ICU 中严重脓毒症发生率为 8.68%, 病死率为 48.7%^[3]。因此脓毒症演变的关键环节及病理生理机制值得深入研究, 以期探索新的干预途径^[4]。

ILTs (免疫球蛋白样转录物), 又名白细胞免疫球蛋白样受体 (LILRs)、单核/巨噬细胞免疫球蛋白样受体 (MIRs) 或 CD85, 是多基因家族成员, 编码基因位于人染色体 19q13.4^[5]。其中 ILT4 主要表达于外周血单核/巨噬细胞, 为一跨膜蛋白, 长胞浆尾含 2~4 个免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIMs), 通过招募蛋白酪氨酸磷酸酶 (SHP) 传递抑制信号^[6]。

本研究拟观察小鼠脓毒症模型中单核细胞表达 ILT4 的生物学行为和效应, 以及对于预后的影响, 以探讨 ILT4 在脓毒症免疫靶向治疗中的临床价值。

1 材料与与方法

1.1 动物

BALB/c ILT4 +/+ (WT)、BALB/c ILT4 -/- 雌性小鼠各 52 只 (25~30 g; 8 同龄)。BALB/c (WT) 小鼠购自中科院上海实验动物中心, BALB/c ILT4 -/- 小鼠委托联科生物公司敲除 ILT4 基因并传代、鉴定。

1.2 CLP 模型制作^[7]

动物术前禁食 12 h; 10% 水合氯醛 0.5 ml/100 g 体质量腹腔注射麻醉; 作腹部正中切口 1.5 cm, 游离盲肠; 距盲肠游离端 3/4 处用 4 号线结扎, 21 G 针头在结扎端中点沿肠系膜纵轴方向贯通穿孔, 两穿刺孔各挤出肠内容物一小滴, 回纳肠管于腹腔, 逐层间断缝合关闭腹腔; 术后立即皮下注射 37℃ 生理盐水 5 ml/100 g; 12 h 昼夜节律, 给予自由进食饮水。

1.3 标本采集

术后 0、6、12、24 h 经心脏穿刺获取血液标本, 室温下静置 20 min, 离心 (2 500 r/min, 20 min) 抽取上清液血清, 于 -20℃ 保存备用; 另 24 h 全血标本经 EDTA 抗凝, 即刻行流式检测。

1.4 单核细胞 ILT4、MHC-II 流式检测

50 μL EDTA 抗凝血, 裂解红细胞、洗涤后制成细胞悬液 (~1 × 10⁸ 个/ml)。按试剂说明逐次荧光标记 CD14 (APC-CD14 单抗 1 μL、美国 eBioscience 公司)、ILT4 (PE-ILT4 单抗 2 μL、美国 eBioscience 公司)、MHC-II (FITC-MHC-II 单

抗 2 μL、美国 eBioscience 公司), 室温孵育后, 用流式细胞仪 (德国 MACSQuant 公司) 定量检测单核细胞 ILT4、MHC-II。

1.5 ELISA 检测血清 IL-6、TNF-α 浓度

取各份血清标本 50 μL 点样至 ELISA 平板小孔, 按试剂盒 (奥地利 Bender 公司) 说明逐次加入缓冲液、生物素化的抗小鼠 IL-6 或 TNF-α 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 Streptavidin 及 TMB 底物振荡、室温孵育, 充分显色后加入终止液终止反应, 立即于 Multiskan Ascent 酶标仪 (芬兰 Labsystems 公司) 450 nm 波长 (参照波长 650 nm) 下读取吸光度值, 经由标准曲线 (试剂盒自带标准样品倍比稀释后检测描记绘制) 计算浓度。

1.6 生存预后观察

BALB/c ILT4 +/+ (WT)、BALB/c ILT4 -/- 两组各 20 只小鼠, CLP 建模术后每 12 h 记录各组小鼠生存数, 记录至 168 h。

1.7 统计学方法

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 18.0 统计软件成组 *t* 检验、Two-Way ANOVA 方法进行统计分析, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义; 应用 Cox-Mantel log-rank 和 Breslow tests 方法对生存率进行统计分析, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症时单核细胞高表达 ILT4

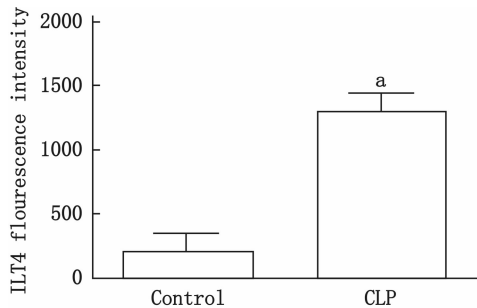
CLP 术后 24 h 脓毒症小鼠外周单核细胞高度表达 ILT4 分子 [(1 292.00 ± 143.70) vs. (193.50 ± 52.54), *t* = 20.31, *P* < 0.05], 见图 1。

2.2 脓毒症时 ILT4 抑制单核细胞 MHC-II 表达

CLP 术后 24 h 较野生型 (WT) 组 ILT4 -/- 小鼠外周单核细胞表达 MHC-II 比率明显增高 [(49.38 ± 5.66)% vs. (24.25 ± 6.76)%, *t* = 8.07, *P* < 0.05], 见图 2。

2.3 脓毒症时 ILT4 促进 IL-6 而非 TNF-α 的表达

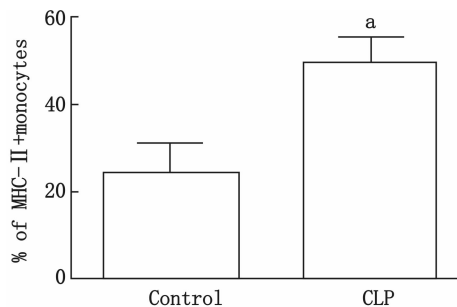
CLP 术后 TNF-α 血清浓度呈单向曲线样变化, 前 6 h 增高明显 [(53.13 ± 5.49) vs. (24.50 ± 4.57), *F* = 110.90, *P* < 0.05], 12 h 恢复至术前水平, 而 ILT4 敲除后对 TNF-α 表达无显著性干扰 [(50.88 ± 6.38) vs. (53.13 ± 5.49), *F* = 0.31, *P* > 0.05] (图 3A)。CLP 术后 24 h 血清 IL-6 显著增高 [(470.75 ± 88.03) vs. (54.25 ± 20.04), *F* = 163.20, *P* < 0.05], ILT4 敲除后很大程度的抑制这一趋势 [(241.25 ± 45.10) vs. (470.75 ± 88.03), *F* = 71.42, *P* < 0.05], 见图 3B。



*P<0.05, n=8

图 1 CLP 术后 24 h 单核细胞表达 ILT4 强度

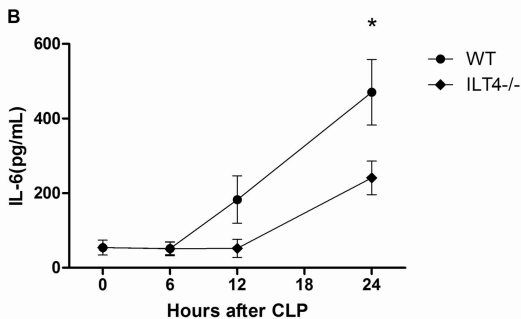
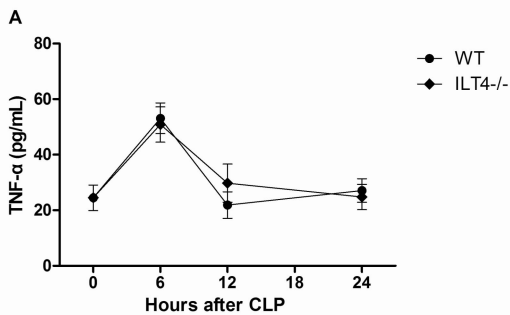
Fig 1 ILT4 fluorescence intensity in monocytes 24 h after CLP



*P<0.05, n=8

图 2 CLP 术后 24 h 表达 MHC-II 单核细胞的比率

Fig 2 Percentage of monocytes expressing MHC-II 24 h after CLP



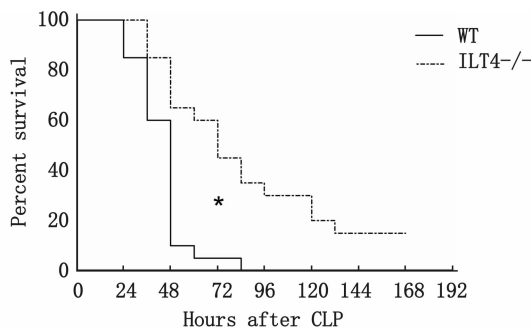
*P<0.05, n=8

图 3 CLP 术后 0、6、12、24 h 血清 TNF-α (A)、IL-6 (B) 浓度变化

Fig 3 Serum TNF-α (A), IL-6 (B) concentrations (pg/mL) at 0, 6, 12, and 24 h

2.4 ILT4 过表达增加脓毒症病死率

ILT4^{-/-}小鼠 CLP 术后生存率较 WT 明显增加 ($\chi^2 = 12.20, P < 0.05$) (图 4)。



*P<0.05, n=20

图 4 CLP 术后 Kaplan-Meier 生存曲线, 每 12 h 记录各组小鼠生存数 (记录至 168 h)

Fig 4 Kaplan-Meier survival curves of different groups of mice showing relative survival in different groups of mice every 12 h for a total 168 h

3 讨论

脓毒症是机体和病原体相互作用而导致的临床综合征, 发病机制复杂, 涉及感染、炎症、免疫、凝血等一系列问题^[8]。脓毒症的不良预后并非完全由病原体及其毒素直接损害所致, 宿主自身反应在病理损伤中同样扮演了重要角色。机体通过模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 和病原体相互作用启动固有免疫反应, 同时这些 PRRs 也可以与一些危险相关分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMPs) 作用, 导致过度炎症反应及免疫麻痹^[9-10]。其中单核细胞所表现出的特殊生物行为引人关注^[11]。

通常按单核细胞的免疫表型和生物学行为大致将其分为两大类^[12]。CD14⁺CD16⁻ “classical monocytes”, 正常情况下为优势亚群, 健康人体内占单核细胞总数的 90% ~ 95%。LPS 刺激时表现为较活跃的吞噬能力并可合成分泌 IL-10^[13], 这通常对机体是有益的; CD14⁺CD16⁺ “non-classical monocytes”, 健康人体内占单核细胞总数的 5% ~ 10%。LPS 可诱导其大量分泌 TNF-α^[13-14], 感染和脓毒症时该细胞亚群明显增加且和疾病不良预后呈正相关^[15]。本研究发现脓毒症时外周血单核细胞特异性高表达 ILT4, 且与血清 IL-6 高水平、单核细胞 MHC-II 低表达率相关, 导致不良预后, 但还不明确该细胞群的具体属性。

本研究发现 CLP 术后 24 h 脓毒症小鼠外周单核细胞高度表达 ILT4 分子 [(1 292.00 ± 143.70) vs. (193.50 ± 52.54), P < 0.05] (图 1)。敲除该基因后脓毒症小鼠的病死率明显降低。针对该现

象, 本实验检测了相关的炎性介质及呈递抗原, 以研究 ILT4 潜在的病理机制。

本研究中 LP 术后 24 h 血清 IL-6 显著增高 [(470.75 ± 88.03) vs. (54.25 ± 20.04), $P < 0.05$], ILT4 敲除后很大程度的抑制这一趋势 [(241.25 ± 45.10) vs. (470.75 ± 88.03), $P < 0.05$] (图 3B), 同时也降低病死率。这一结论与 Gomez 等^[16]的临床研究是一致的。更早的研究提示血清 IL-6 > 1 000 pg/mL 时脓毒症患者的病死率为 56%, 而 < 1 000 pg/mL 组的病死率仅为 40%^[17]。

但 ILT4 对另一主要的炎性介质 TNF- α 表达无显著性干扰 [(50.88 ± 6.38) vs. (53.13 ± 5.49), $P > 0.05$] (图 3A), 这一实验结果让人意外。通常认为脓毒症时高 TNF- α 水平与高病死率相关^[18]。或能解释为作为超早期的炎性介质 TNF- α 不受 ILT4 调控, 且较单一的炎性介质或细胞因子而言脓毒症的不良预后与过度炎症反应的持续性关系更为密切。

同时也发现 CLP 术后 24 h 较 WT 组 ILT4-/-小鼠外周单核细胞表达 MHC-II 比率明显增高 [(49.38 ± 5.66)% vs. (24.25 ± 6.76)%, $P < 0.05$] (图 2)。MHC-II 传递细胞外部的信息, 例如组织中有细菌侵入, 则巨噬细胞进行吞食后, 把细菌碎片利用 MHC-II 提供给辅助性 T 细胞, 启动免疫反应, 因此其表达的高低在机体应答感染时至关重要。对应人类的同类分子 HLA-DR, 既往的研究提示单核细胞 HLA-DR 表达 < 40% 可作为脓毒症免疫状态及预后指标的界值^[19]。苏磊等在 ICU 脓毒症患者的研究中同样证实, 单核细胞 HLA-DR < 30% 者全部死亡, < 40% 者病死率 80%, 这与该实验所观察到的结果是一致的。

参考文献

- [1] Singer M, Deutshman 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] 苏磊, 徐秋林. 精准医学时代的脓毒症研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25 (2): 133-138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.02.001.
- [3] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China [J]. Crit Care Med, 2007, 35 (11): 2538-2546. DOI: 10.1097/01.CCM.0000284492.30800.00.
- [4] 何小军, 马岳峰. 脓毒症: 我们能做些什么? [J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26 (5): 483-487. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.05.001.
- [5] Barrow AD, Trowsdale J. The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses [J]. Immun Rev, 2008, 224 (1): 98-123. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x.
- [6] Borges L, Cosman D. LIRs/ILTs/MIRs. inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells [J]. Cytok Growth Factor Rev, 2000, 11 (3): 209-217. DOI: 10.1016/S1359-6101(00)00007-1.
- [7] Rittirsch D, Huberlang 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.
- [8] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 885-891. DOI: 10.1038/nature01326.
- [9] Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis [J]. Lancet Infectious Diseases, 2008, 8 (1): 32-43. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70265-7.
- [10] Anas AA, Wiersinga WJ, Vos AFD, et al. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis [J]. Neth J Med, 2010, 4: 147-150.
- [11] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock [J]. Lancet, 2005, 365 (9453): 63-78. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17667-8.
- [12] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood [J]. Blood, 2010, 116 (16): e74-80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
- [13] Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells [J]. Ann Rev Immun, 2009, 27 (1): 669-692. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
- [14] Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties [J]. Immunity, 2003, 19 (1): 71-82. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2.
- [15] Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Skurnik D, et al. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an Fc γ gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation [J]. Nat Med, 2007, 13 (11): 1368-1374. DOI: 10.1038/nm1665.
- [16] Gomez HG, Gonzalez SM, Londö JM, et al. Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: A longitudinal study [J]. Crit Care Med, 2014, 42 (4): 771-780. DOI: 10.1097/CCM.000000000000100.
- [17] Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, et al. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis [J]. Crit Care Med, 1999, 27 (9): 1814-1818. DOI: 10.1002/chin.199923285.
- [18] Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease [J]. Lancet, 1987, 1 (8529): 355-357. DOI: 10.1016/S0140-6736(87)91728-4.
- [19] Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, et al. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections [J]. Clin Diag Lab Immun, 2004, 11 (1): 161-167. DOI: 10.1128/CDLI.11.1.161-167.2004.

(收稿日期: 2017-08-04)

(本文编辑: 何小军)