论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1834-04

IL-15改善铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的免疫抑制

王晓娟,刘德贵,杨 勇,张彦标,薛 刚 (610083 成都,成都军区总医院烧伤整形科)

[摘要] **目的** 探讨IL-15是否能够有效纠正脓毒症小鼠的免疫抑制,改善脓毒症小鼠的生存率。**方法** 将铜绿假单胞杆菌经尾静脉注射至C57雄性小鼠构建脓毒症小鼠模型,模型小鼠分为3组:对照组和0.5、1 μg IL-15组,分别腹腔注射生理盐水,0.5、1 μg IL-15。观察脓毒症小鼠的生存时间,计算脏器细菌定植数量,检测小鼠T细胞和NK细胞的含量,并测定小鼠外周血细胞因子IFN-γ的表达水平。**结果** 0.5、1 μg IL-15组小鼠生存时间为(3.8±3.9)和(5.0±4.9) d,明显长于对照组[(1.9±0.9) d]。腹腔注射IL-15后,小鼠脾脏细菌的定植量[0.5 μg组:(15.4±2.9)×10^3 CFU/μg,1 μg组:(9.7±1.5)×10^3 CFU/μg]显著低于对照组[(29.8±3.2)×10^3 CFU/μg, $P<0.01$]。腹腔注射1 μg IL-15有效的增加了小鼠T细胞[(69.84±13.28)% *vs* (58.63±6.25)%, $P<0.01$]、NK细胞的数量[(20.96±5.78)% *vs* (9.83±1.36)%, $P<0.01$]和IFN-γ的表达水平[(526.1±23.8) pg/ml *vs* (289.4±16.2) pg/ml, $P<0.01$]。**结论** IL-15能够有效的纠正脓毒症小鼠的免疫抑制,充分活化天然免疫系统和获得性免疫系统,从而改善脓毒症小鼠的生存状况。

[关键词] IL-15;脓毒症;免疫细胞;IFN-γ;小鼠

[中图法分类号] R-332; R392.1; R631.2 [文献标志码] A

Effect of IL-15 on immunosuppression of mice with sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*

Wang Xiaojuan, Liu Degui, Yang Yong, Zhang Yanbiao, Xue Gang (Department of Burn and Plastic Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] Objective To investigate whether IL-15 can efficiently correct the immunosuppression of mice with sepsis, and to improve the survive rate of mice with sepsis. Methods *Pseudomonas aeruginosa* was injected into C57 mice *via* the caudal vein to build a mouse model of sepsis. The mice with sepsis were divided into a control group (treated by physiological saline *via* i. p. injection), a first treatment group (treated by 0.5 μg IL-15 *via* i. p. injection), and a second treatment group (treated by 1 μg IL-15 *via* i. p. injection). The survival time of the mice with sepsis was observed. The quantity of bacteria immobilized to the spleens of the mice with sepsis was calculated. The T cell content and NK cell content in mouse blood were analyzed. The expression level of IFN-γ in the peripheral blood of the mice was analyzed. Results The survival time of the mice with sepsis in the control group (1.9±0.9 d) was significantly shorter than those in the first and second treatment groups (3.8±3.9 d and 5.0±4.9 d). The quantity of bacteria immobilized to the spleens of the mice with sepsis in the control group [(29.8±3.2)×10^3 CFU/μg] was significantly larger than those in the first and second treatment groups [(15.4±2.9)×10^3 CFU/μg and (9.7±1.5)×10^3 CFU/μg, $P<0.01$]. The T cell content and NK cell content in mouse blood of the control group [(58.63±6.25)% and (9.83±1.36)%] were significantly lower than those in the first treatment group [(65.32±10.36)% and (18.25±5.24)%, $P<0.01$] and the second treatment group [(69.84±13.28)% and (20.96±5.78)%, $P<0.01$]. The expression level of IFN-γ in the peripheral blood of the mice in the control group was significantly lower than those in the treatment groups ($P<0.01$). Conclusion IL-15 can efficiently correct the immunosuppression of mice with sepsis and adequately activate their natural immune systems and adaptive immune systems, so as to improve the survival rate.

[**Key words**] IL-15;sepsis;immune cells; IFN-γ;mice

Corresponding author: Xue Gang, Tel:86-28-86570630, E-mail:kpardan@163.com

[通信作者] 薛 刚,电话:(028)86570630,E-mail:kpardan@163.com

IL-15 是一种广泛分布于人体组织和细胞的一种细胞因子,其相对分子质量为(14 ~ 15) × 10^3,主要由巨噬细胞产生。由于其受体广泛分布于各种免疫细胞表面,因此 IL-15 能够发挥多种免疫功能,如刺激 PHA 活化的外周血 T 细胞增殖,刺激活化的 B 细胞分泌抗体,促进 NK 细胞增殖和分泌细胞因子增强 NK 细胞的细胞毒活性等[1-2]。

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征,过度的免疫反应引起随后的免疫抑制是其重要特点。而多项研究证实,天然免疫和获得性免疫系统的多种免疫细胞在免疫抑制期功能均有一定的损害。患者处于免疫抑制期,无法抵抗致病微生物的入侵,从而进一步加重机体的感染[3]。由于 IL-15 能够有效的活化天然免疫和获得性免疫系统的多种细胞,本研究将 IL-15 静脉注射至脓毒症小鼠模型,发现注射 IL-15 后,能够有效地提高脓毒症小鼠的生存时间,减少多个器官菌落数,以及提高体内 T 细胞以及 NK 细胞的数量和促进多种细胞因子的分泌。

1 材料与方法

1.1 材料及动物分组

铜绿假单胞杆菌株 PAO1(SBI-N)(成都军区总医院中心实验室);小鼠重组 IL-15、PE-antiNK1.1、FITC-antiCD3(eBioscience 公司);IFN-γELISA 试剂(奥地利,Bender MedSystems 公司)。

C57BL/6(H-2b)近交系 6 ~ 8 周雄性小鼠 60 只(成都军区总医院中心实验室),体质量 20 ~ 30 g。按随机数字表法分为 3 组:对照组和 0.5、1 μg IL-15 组,分别腹腔注射生理盐水,0.5、1 μg IL-15。生存时间测定实验每组 10 只小鼠,其余实验每组 5 只小鼠。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞杆菌菌株 采用的菌株为烧伤创面分离的铜绿假单胞杆菌株 PAO1(SBI-N)。在胰化大豆琼脂平板中挑选细菌的单克隆,放置与 LB 培养基中,37 ℃震荡过夜。LB 培养基的吸光度值在 1.5 时代表细菌处于对数生长期增殖,收获 LB 培养基,4 ℃高速离心(6 800 × g, 3 min)后获得对数生长期的细菌,PBS 清洗后调整浓度,采用连续稀释法计算细菌个数[4]。

1.2.2 铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠模型的建立[4] 将计数好的 PAO1 稀释浓度为 10^9CFU/ml,取 100 μl 菌液经小鼠尾静脉注射至 C57 小鼠。

1.2.3 生存曲线 3 组小鼠在尾静脉注射细菌后 30 min 开始腹腔注射生理盐水和 0.5、1 μg IL-15。观察各组生存时间。

1.2.4 脏器细菌定量 注射细菌 24、48、72 h 后颈椎脱臼处死小鼠,无菌条件下取脾脏并分别称量(g)。10 ml 生理盐水研磨小鼠脾脏并收集悬液,取 10 μl 涂布于营养琼脂培养板上,37 ℃ 孵箱培养过夜,12 h 后计数细菌菌落数(CFU)。器官细菌定量 = CFU/W。

1.2.5 免疫细胞数量 分别于实验后 48 h 从小鼠眼眶取血 0.2 ~ 0.5 ml,经红细胞裂解液处理后去除红细胞,PBS 漂洗 3 次。用含 0.5% BSA 的 PBS 重悬细胞,并调整细胞浓度为 1 × 10^6/ml。应用 PE-antiNK1.1、FITC-antiCD3 标记细胞,检测 NK 细胞含量;应用 PE-antiCD3 标记细胞检测 T 细胞含量。

1.2.6 模型小鼠血清中细胞因子 IFN-γ 含量的测定:ELISA 法检测小鼠外周血血清中 IFN-γ 含量:分别于实验后 48 h 从小鼠眼眶取血 0.5 ~ 1 ml,室温静置 15 min 后,3 000 × g 离心,取上清。根据 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 IFN-γ 含量(n = 5)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本正态数据采用单因素方差分析,两样本正态数据采用独立样本 t 检验。

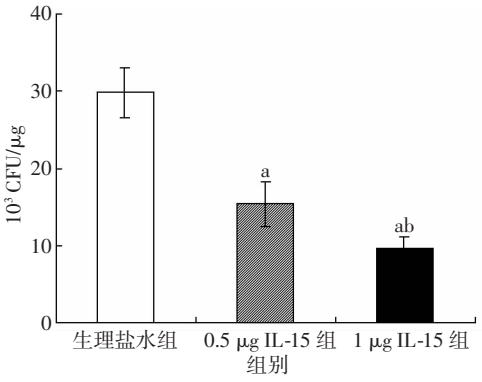
2 结果

2.1 腹腔注射 IL-15 延长铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的生存时间

对照组的小鼠生存(1.9 ± 0.9) d,而 0.5、1 μg IL-15 组小鼠分别生存(3.8 ± 3.9) d 和(5.0 ± 4.9) d,明显长于对照组。提示腹腔注射 IL-15 能够有效地提高铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的生存时间,其生存时间随着 IL-15 剂量的增高而延长。

2.2 腹腔注射 IL-15 减少铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠脾脏的细菌定植数量

结果显示:IL-15 能够有效地减少小鼠脾脏细菌定植的情况,并且随着 IL-15 剂量的增加,小鼠脾脏细菌定植量进一步减少(P < 0.01)(图 1)。



a:P < 0.01,与生理盐水组比较;b:P < 0.01,与 0.5 μg IL-15 组比较

图 1 铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠脾脏细菌定植情况

2.3 腹腔注射 IL-15 增加了铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠 T 细胞以及 NK 细胞的数量

流式细胞仪检测了模型小鼠外周血的天然免疫细胞 NK 细胞以及获得性免疫细胞 T 细胞的百分含量,结果发现腹腔注射了 IL-15 的脓毒症小鼠 T 细胞以及 NK 细胞的百分含量均显著高于对照组小鼠(P < 0.01)(表 1)。

表 1 小鼠外周血 T 细胞以及 NK 细胞的百分含量[n = 5, ($\bar{x} \pm s$)%]

组别	T 细胞	NK 细胞
对照组	58.63 ± 6.25	9.83 ± 1.36
0.5 μg IL-15 组	65.32 ± 10.36[a]	18.25 ± 5.24[a]
1 μg IL-15 组	69.84 ± 13.28[a]	20.96 ± 5.78[a]

a:P < 0.01, 与对照组比较

2.4 腹腔注射 IL-15 有效的增加了铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠体内 IFN-γ 的分泌

腹腔注射 1 μg IL-15 后，小鼠外周血 IFN-γ 的含量(526.1 ± 23.8) pg/ml 显著高于对照组小鼠[(289.4 ± 16.2) pg/ml，$P<0.01$]。

3 讨论

脓毒症是指由感染或有高度可疑感染灶引起的全身炎症反应综合征，机体的免疫系统特别是免疫细胞，包括天然免疫细胞以及特异性免疫细胞功能上均有一定程度的损害，使得机体无法适当的发挥清除致病微生物的功能[5-6]。文献报道，脓毒症能够诱导 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC 细胞以及单核细胞的凋亡，严重的破坏机体免疫细胞的功能，使得机体无法有效的清除初始感染的致病微生物，并且增加了再次感染的可能性[3,7]。大量证据表明，免疫抑制是脓毒症的最终结果，是造成机体损伤的主要原因，因此免疫调节因子可能成为脓毒症的潜在有效治疗方式之一。在本研究中，我们选取了天然免疫细胞以及获得性免疫细胞功能的调节因子 IL-15，将其应用于铜绿假单胞杆菌引起的脓毒血症的小鼠模型中，研究其纠正脓毒血症引起的免疫抑制的能力。

IL-15 能够有效的活化机体的天然免疫以及获得性免疫系统，它是 $CD8^+$ T 细胞活化所必需的细胞因子，同时也是 NK 细胞活化的重要的细胞因子[8-9]。机体有效的清除致病微生物，需要获得性免疫细胞和天然免疫系统的共同作用，因此，IL-15 能够最大程度的提高机体的免疫反应，从而有效的清除机体致病微生物的感染[1,10]。

本研究将一定量的铜绿假单胞杆菌通过尾静脉注射至小鼠体内，构建了脓毒血症模型，腹腔注射不同剂量的 IL-15。我们首先观察了小鼠的生存时间，判断其是否具有保护机体的作用。对照组小鼠均在 72 h 内死亡，表明该模型构建有效。结果表明，腹腔注射 IL-15 在不同程度上延长了铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的生存时间，提示 IL-15 能够在一定程度上纠正细菌引起的脓毒症对机体的损伤。我们进一步评价了铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠脾脏的细菌定植数量，发现 IL-15 注射组小鼠脾脏细菌的定植数目显著低于对照组小鼠，提示 IL-15 有效地提高了机体的免疫系统清除致病微生物的能力。本研究探讨了 0.5 μg 以及 1 μg 两个不同剂量 IL-15 对铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的影响，发现 1 μg IL-15 的疗效要优于 0.5 μg 组，但是在本实验中，由于只有 2 个剂量组，并不能充分说明 IL-15 的功能与剂量成正比。

明确了 IL-15 对铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠的作用后，本研究评价了其对于天然免疫系统的 NK 细胞和获得性免疫系统 T 细胞的影响。淋巴细胞增殖是淋巴细胞活化的主要方式之一，因此，我们检测了模型小鼠体内 T 细胞以及 NK 细胞的百分含量。结果提示：NK 细胞和 T 细胞的百分含量均显著提高。本研究中，NK 细胞的提高更为显著，可能由于我们检测的为铜绿假单胞杆菌脓毒症小鼠 48 h 时的免疫细胞的情况，机体的天然免疫系统活化较为迅速，是早期发挥作用的主要成分。IL-15 在促进免疫细胞活化的同时，同样提高了机体 IFN-γ 的含量。IFN-γ 是机体清除致病微生物的主要细胞因子[11-12]，主要有活化的 NK 细胞和 T 细胞分泌，进一步说明了在脓毒症小鼠体内，IL-15 有效的活化了机体的获得性免疫系统和天然免疫系统。

本实验研究证实 IL-15 治疗后的小鼠体内 T 淋巴细胞以及 NK 细胞的数量显著增加，有效的增加了脓毒症小鼠的免疫能力，结合文献，我们分析该作用可能与其抑制淋巴细胞的凋亡有关。文献[13-14]报道，IL-15 能够显著的增加脓毒症小鼠 T 细胞、NK 细胞以及 DC 细胞的抗凋亡分子 Bcl-2 的表达，而造血细胞的生存主要取决于 Bcl-2 家族成员中的抗凋亡因子与凋亡因子的平衡[14]。其中重要的抗凋亡机制之一则为 IL-15 能够有效地增加 $CD8^+$ T 细胞的 Bcl-2 的表达。同时，文献报道，IL-15 抑制 NK 细胞凋亡的主要机制则为促进 Erk1 和 Eek2 激酶的磷酸化从而降低 Bim 的表达[15]。我们推测，IL-15 通过以上的信号通路有效地抑制了淋巴细胞的凋亡，使得淋巴细胞的生存时间以及活化时间延长，增强了其生物学效应，促进了 IFN-γ 的分泌。

总之，IL-15 具有广泛的抗凋亡功能，在小鼠脓毒症模型中，能够有效地抑制脓毒症引起的天然免疫细胞 NK 细胞以及获得性免疫细胞 T 细胞的凋亡，促进免疫细胞活化以及功能的发挥，促进 IFN-γ 的分泌，有效地改善了脓毒症小鼠的生存率，提示 IL-15 可能是一种有效的潜在治疗脓毒症的免疫调节因子。

参考文献：

[1] Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 657-679.

[2] Motegi A, Kinoshita M, Inatsu A, *et al*. IL-15-induced CD8 + CD122 + T cells increase antibacterial and anti-tumor immune responses: implications for immune function in aged mice[J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(4): 1047-1056.

[3] Remick D G. Pathophysiology of sepsis[J]. Am J Pathol, 2007, 170(5): 1435-1444.

[4] Borchers M T, Harris N L, Wesselkamper S C, *et al*. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa[J]. Infect Immun, 2006, 74(5): 2578-2586.
[5] Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. N Engl J Med, 2003, 348(2): 138-150.
[6] Murphy T J, Paterson H M, Mannick J A, *et al*. Injury, sepsis, and the regulation of TolL-like receptor responses[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(3): 400-407.
[7] Wesche-Soldato D E, Swan R Z, Chung C S, *et al*. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis[J]. Curr Drug Targets, 2007, 8(4): 493-500.
[8] Fehniger T A, Cooper M A, Caligiuri M A. InterleukiN-2 and interleukiN-15: immunotherapy for cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 169-183.
[9] Sotiriadou N N, Perez S A, Gritzapis A D, *et al*. Beneficial effect of short-term exposure of human NK cells to IL15/IL12 and IL15/IL18 on cell apoptosis and function[J]. Cell Immunol, 2005, 234(1): 67-75.
[10] Fehniger T A, Caligiuri M A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease[J]. Blood, 2001, 97(1): 14-32.
[11] Prass K, Meisel C, Hoflich C, *et al*. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation[J]. J Exp Med, 2003, 198(5): 725-736.
[12] Docke W D, Randow F, Syrbe U, *et al*. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment[J]. Nat Med, 1997, 3(6): 678-681.
[13] Inoue S, Unsinger J, Davis C G, *et al*. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis[J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1401-1409.
[14] Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 189-200.
[15] Huntington N D, Puthalakath H, Gunn P, *et al*. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and McL-1[J]. Nat Immunol, 2007, 8(8): 856-863.

(**收稿**:2011-03-22;**修回**:2011-04-09)
(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2011)17-1837-01

个案与短篇

经皮颈动脉闭塞后再通并支架置入1例

唐思治,罗霄鹏,熊 峰,唐兰英 (412000 湖南 株洲,株洲市一医院神经内科)

[**关键词**] 颈动脉闭塞;再通;支架置入
[**中图法分类号**] R543.405 [**文献标志码**] B

颈内动脉颅外段粥样硬化闭塞性病变是缺血性卒中的重要病因之一,其所致脑梗死受多种因素影响,如狭窄程度和侧支循环等[1]。我科近期完成颈内动脉闭塞再通支架置入术1例,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,62岁,因"头晕、左侧肢体麻木、乏力10 d"于2011年2月23日急诊入院。患者下车时突发头晕,左侧肢体麻木、乏力,持续数秒钟后好转,在外院头颅CT检查未见异常,患者后来间发左侧肢体无力,来我院以"脑梗死"收治我科。否认"高血压、糖尿病、心脏病"。查体:生命体征平稳,心肺无异常发现。神经系统检查:意识清楚,精神欠佳,言语清楚流利,左侧鼻唇沟轻度变浅,伸舌居中;四肢肌力肌张力正常,左侧肢体痛觉轻度减退(与右侧相比约减少40%),病理反射未引出,NIHSS评分:2分。颈部血管彩超检查:双侧颈动脉硬化并粥样斑块形成,右侧颈内动脉入口处斑块堵塞并血流量减少。头颅MRI:右侧额顶叶多灶性脑梗死。入院5 d后行DSA检查,结果发现:右侧颈内动脉完全闭塞(图1),右侧后交通动脉代偿右侧大脑中动脉,左侧颈内动脉造影未见前交通动脉开放。经与家属谈话并签写手术同意术,于3月6日予患者行右侧颈内动脉闭塞后再通并支架植入术。

8F导引导管置于右侧颈总动脉远端近颈内动脉闭塞处,微导丝在微导管支撑下,快速转动微导丝,钻通右侧颈内动脉闭塞处,将微导管送达颈内动脉远端,退出微导丝,微导管造影见右侧大脑中动脉显影良好,将0.010交换导丝通过微导管送到右侧颈内动脉虹吸部,予EV3(Protégé 1 mm×1.5 mm)球囊沿交换导丝送到狭窄处在11个大气压下预扩,满意后予EV3(Protégé 2.5 mm×1.5 mm)球囊沿交换导丝送到狭窄处在12个大气压下预扩,满意后做路径图,在路径图指导下,通过快速交换,将EV3 6F保护伞送达右侧颈内动脉狭窄段远端约10 cm处,退出交换导丝,予自彭式EV3[(6~8) mm×40 mm]支架沿保护伞导丝送到狭窄处,释放支架,造影见狭窄解除,支架远端仍有局限性狭窄约60%。将自彭式EV3(Protégé 6 mm×30 mm)支架送到原支架远端并部分重叠,释放支架,造影见支架贴壁良好,狭窄解除(图2),退下保护伞,造影见颈内动脉远端充盈良好,右侧大脑中动脉显影良好,手术结束。

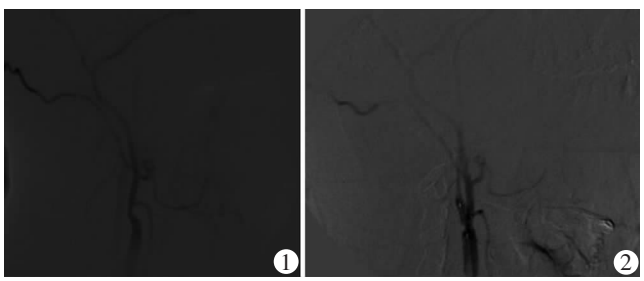


图1 右侧颈内动脉造影示右侧颈内动脉闭塞
图2 钻通闭塞处后支架植入血管造影 见狭窄解除

[**通信作者**] 罗霄鹏,E-mail:ZZLXP0525@sina.com

(下转1842页)