DOI:10.16016/j.1000-5404.202105039

全胃肠外营养对幼鼠免疫功能和炎症反应的影响

沈蕾蕾[1],孙晓东[1],郑瑞雪[1],赵庆宁[2],青旭容[1],陈 盛[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:儿科[1],病理科,全军临床病理学研究所[2]

[摘要] **目的** 探讨全胃肠外营养(total parenteral nutrition,TPN)对幼鼠免疫功能及全身炎症的影响。**方法** 将18只6~8周龄的SD雄性幼鼠分为3组:正常组、对照组和TPN组,每组6只。正常组不予置管,对照组幼鼠行右颈静脉置管后予以生理盐水治疗,对照组和正常组幼鼠均喂食标准鼠粮和水,TPN组幼鼠行右颈静脉置管后予以TPN治疗,并禁食、禁水,14 d后处死幼鼠。采用全自动流式血细胞计数仪检测外周血的血常规,流式细胞术检测脾脏细胞中HLA-DR表达、外周血Treg细胞比例、内毒素诱导单核细胞产生TNF-α的能力、淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$ T)凋亡以及用植物血凝素(phytohemagglutinin,PHA)刺激后产生IFN-γ的能力,ELISA法检测外周血血浆中IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4水平。**结果** 与正常组及对照组比较,TPN组幼鼠静脉血淋巴细胞数量减少($P<0.05$),脾脏细胞HLA-DR表达降低($P<0.05$),TPN组幼鼠外周血Treg细胞的比例(8.54±1.20)明显高于正常组(3.02±1.49)及对照组(3.00±0.75)幼鼠,差异有统计学意义($P<0.05$)。TPN组幼鼠经内毒素诱导产生TNF-α的细胞所占比例(8.73±3.11)明显低于正常组(39.07±16.17)及对照组(43.23±18.40),而$CD4^+$T淋巴细胞经PHA刺激后所产生IFN-γ的百分比TPN组(0.65±0.46)明显少于正常组(2.94±1.62)与对照组(2.97±1.39),差异均有统计学意义($P<0.05$),TPN组幼鼠淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$T)晚期凋亡增多($P<0.05$),IL-1β、TNF-α水平增加($P<0.05$)而IL-10、IL-4水平降低($P<0.05$)。**结论** 持续2周的TPN可导致幼鼠先天性及获得性免疫功能受损,促炎因子增加,尽早开始肠内营养对于减少免疫损伤及全身炎症具有重要意义。

[关键词] 全胃肠外营养;免疫功能;炎症;流式细胞术

[中图法分类号] R-332;R392.1;R459.3 [文献标志码] A

Effects of total parenteral nutrition on immune function and inflammatory response in young rats

SHEN Leilei[1], SUN Xiaodong[1], ZHENG Ruixue[1], ZHAO Qingning[2], QING Xurong[1], CHEN Sheng[1] [1]Department of Pediatrics, [2]Department of Pathology, PLA Institute of Clinical Pathology, First Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objectives** To investigate the effects of total parenteral nutrition (TPN) on immune function and systemic inflammation in young rats. **Methods** Eighteen young male SD rats aged 6 to 8 weeks were randomly divided into 3 groups: normal group, control group and TPN group, with 6 rats in each group. The rats in the normal group were not catheterized, and those in the control group were treated with normal saline after right jugular vein catheterization. The rats in the control group and normal group were fed standard food and water, and those in the TPN group were treated with TPN after right jugular vein catheterization, fasting and water abdication. All the young rats were sacrificed in 14 d later. The blood routine of peripheral blood was detected by automatic flow cytometry. The expression of HLA-DR in spleen cells, the proportion of

[基金项目] 陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2019XQY09)

[通信作者] 陈 盛,E-mail:562437300@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Treg cells in peripheral blood, the ability of endotoxin-induced monocytes to produce TNF-α, apoptosis of lymphocytes ($CD4^+$, $CD8^+$ T cells) and the ability of IFN-γ production after stimulation by phytohemagglutinin (PHA) were detected by flow cytometry. The levels of IL-1β, TNF-α, IL-10 and IL-4 in peripheral blood plasma were determined by ELISA. **Results** Compared with normal group and control group, the number of venous blood lymphocytes was decreased ($P<0.05$), the HLA-DR expression level in spleen cells was reduced ($P<0.05$), the proportion of Treg cells in peripheral blood was significantly higher in the TPN group (8.54±1.20) than that in the normal group (3.02±1.49) and the control group (3.00±0.75) ($P<0.05$). The proportion of TNF-α induced by endotoxin was significantly lower in the TPN group (8.73±3.11) than the normal group (39.07±16.17) and control group (43.23±18.40). The percentage of IFN-γ produced by $CD4^+$T lymphocytes stimulated by PHA was significantly lower in the TPN group (0.65±0.46) than the normal group (2.94±1.62) and the control group (2.97±1.39), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The TPN group had increased apoptosis of lymphocytes ($CD4^+$ $CD8^+$ T cells) at late stage ($P<0.05$), increased IL-1β and TNF-α levels ($P<0.05$) while decreased IL-10 and IL-4 levels ($P<0.05$). **Conclusion** TPN sustained for 2 weeks can lead to congenital and acquired immune impairment and increase of pro-inflammatory factors in young mice. Early initiation of enteral nutrition is of great significance to reduce immune injury and systemic inflammation.

[**Key words**] total parenteral nutrition; immunologic function; inflammation; flow cytometry

Supported by the Special Project of Science and Technology Innovation Ability Enhancement of Army Medical University (2019XQY09). Corresponding author: CHEN Sheng, E-mail 562437300@qq.com

全胃肠外营养(total parenteral nutrition,TPN)是重要的营养支持治疗手段,已广泛应用于儿童及成人。早产儿尤其是极低或超低出生体重儿,早期肠内喂养困难,通常需要接受 TPN。部分早产儿由于合并窒息、感染、出血等,胃肠内营养受到限制,也需要接受 TPN;除此之外,患坏死性小肠结肠炎、短肠综合征、胃肠道手术术后等患儿,通常需要接受长时期的 TPN 治疗。因此,TPN 对于肠内喂养不耐受或肠内喂养禁忌的患儿来说是挽救其生命的关键治疗措施[1-2]。

然而,TPN 的应用也存在着许多并发症,包括血栓形成、肝损伤、感染风险和代谢紊乱等,其中继发感染是其重要的并发症之一。有研究表明,长期接受胃肠外营养(parenteral nutrition,PN)的新生儿医院内感染发生率高达 47.8%[3],是导致新生儿致残率及病死率增加、住院时间延长以及医疗费用增加的重要原因,而>2 周的 TPN 治疗是院内感染的独立危险因素[4-5]。但 TPN 引起感染并发症的机制尚不清楚。由于临床研究常常受到基础疾病的影响,故本研究拟通过建立 TPN 幼鼠动物模型,研究其接受 2 周 TPN 对先天性及获得性免疫功能的影响以及炎症因子的变化,为探索 TPN 致感染并发症的发病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本研究中涉及的动物伦理已通过陆军军医大学动物伦理委员会批准[AMUWEC20201551]。18 只雄性 SD 幼鼠(6~8 周龄,体质量 220~240 g)购于陆军军医大学实验动物中心。将 SD 幼鼠分为 3 组:正常组(不予静脉置管,喂食标准鼠粮和水)、对照组[行右颈静脉置管,在输液泵控制(1.5 mL/h)下输入生盐理水,持续 14 d,同时喂食标准鼠粮和水]和 TPN 组[幼鼠行右颈静脉置管在输液泵控制(1.5 mL/h)下输入 TPN 营养液并禁食、禁水],每组 6 只。

1.2 TPN 营养液的配制

TPN 组幼鼠根据 CAROLINE 等[6]建模方法配制并输入 TPN 营养液 14 d(205 kcal/kg·d),TPN 溶液每升中包含 450 mL 复方氨基酸(华润双鹤制药公司,中国),360 mL 50% 葡萄糖(大冢制药有限公司,中国),140 mL 脂肪乳(费森尤斯卡比华瑞制药有限公司,中国),同时添加微量元素、维生素和电解质,颈静脉置管术后 24 h 内 TPN 输液速度减半,24 h 后改为正常输注速度。对照组幼鼠经中心静脉导管持续输注 0.9% NaCl,并与正常组幼鼠同样正常进食进水。

1.3 主要试剂及仪器

1.3.1 试剂 细胞因子(IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4)ELISA 检测试剂盒(碧云天公司,中国),流式荧光抗体染料 APC-cy7 live/dead dye(Invitrogen 公司,美国),FITC 标记的 anti-rat MHC-Ⅱ(HLA-DR)抗体

(Thermofisher 公司,美国),FITC 标记的 anti-rat Foxp3 抗体、PE 标记的 anti-rat TNFα 抗体、PE 标记的 anti-rat CD25 抗体、PE-cy7 标记的 anti-rat CD8 抗体、APC 标记的 anti-rat CD3 抗体、PerCP 标记的 anti-rat CD11b 抗体、PB 标记的 anti-rat IFNγ 抗体、LPS、PHA、DNase Ⅰ(Biolegend 公司,美国),PB 标记的 anti-rat CD4 抗体、Annexin V/7AAD apoptosis kit、GolgiStop、Golgi Plug (BD Pharmingen 公司,美国)。

1.3.2 仪器 全自动流式血细胞计数仪(希森美康公司,日本)、酶标仪(Thermofisher 公司,美国)、流式细胞仪(BD Pharmingen 公司,美国)。

1.4 标本收集

所有组别幼鼠禁食 6 h 经腹腔麻醉后通过腹主动脉穿刺获取血液标本并同时获取脾脏标本。留取部分血液样本经 450×*g* 离心 15 min 后留取血浆,剩余血液标本及脾脏组织经红细胞裂解液处理获取白细胞及脾脏细胞。

1.5 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中炎症因子的含量

将待测的血浆及相关 ELISA 试剂盒准备好,包被抗体:按说明步骤用 1×包被液稀释包被抗体,然后将稀释的包被抗体,加入 96 孔板(100 μL/孔),置于 4 ℃冰箱过夜。操作步骤如下:洗板、封闭、孵育标准品和样本、孵育检测抗体 10~15 min。显色反应和终止反应后,使用酶标仪检测波长在 450 nm 处 96 孔板各孔光密度值 *D*(450)。采用 Read-er Fit ELISA 软件进行分析,根据标准品 *D*(450) 值绘出标准曲线,计算样品细胞因子含量。

1.6 流式细胞术

1.6.1 脾脏细胞中 HLA-DR 表达情况 取每组幼鼠脾脏加入红细胞裂解液在滤网上研磨后静置 3 min 收集悬液,经 507×g 离心 5 min,弃上清,FACS 液洗涤 2 次后以 FACS 液重悬,悬液中加入 APC 标记的 anti-rat CD3 抗体、PerCP 标记的 anti-rat CD11b 抗体、FITC 标记的 anti-rat MHC-Ⅱ(HLA-DR)抗体、APC-cy7 live/dead dye,室温孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测脾脏细胞 HLA-DR 表达情况。

1.6.2 检测淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$T)的凋亡情况及 Treg 细胞比例 取每组幼鼠全血经裂解红细胞处理后向所得沉淀中加入 FACS 液重悬,向需检测凋亡的 EP 管中加入 PB 标记的 anti-rat CD4 抗体、PE-cy7 标记的 anti-rat CD8 抗体,冰上孵育 30 min 后用冰的 PBS 洗涤 2 次,并用 Binding buffer(1×)重悬细胞至浓度为 1×10^6/mL,转移 100 μL 的混悬液至 5 mL EP 管中,加入 5 μL PE Annexin V 和 5 μL 的 7-ADD,轻轻斡旋后常温避光孵育 15 min,结束后加入 1×Binding buffer 在 1 h 内用流式仪检测淋巴细胞凋亡情况。向需检测 Treg 细胞的 EP 管中加入 APC 标记的 anti-rat CD3 抗体、PE 标记的 anti-rat CD25 抗体、APC-cy7 live/dead dye、PB 标记的 anti-rat CD4 抗体,冰上孵育 30 min 后用 FACS 液洗涤 2 次,加入 1mL 新鲜制备的 1×Fix/Perm 缓冲液,重悬 3 s 后 4℃避光培养 40~50 min,时间结束后用 1×perm wash 洗涤 2 次,弃上清,加入 100 μL 1×perm wash,向悬液中加入 FITC 标记的 anti-rat Foxp3 抗体,冰上培养 40~50 min,最后以 1×perm wash 洗涤 2 次后用流式细胞仪检测 Treg 细胞比例。

1.6.3 检测诱导产生炎症相关因子的细胞 用内毒素诱导单核细胞产生 TNF-α 以及用植物血凝素(phytohemagglutinin,PHA)刺激淋巴细胞($CD4^+$T),产生 IFN-γ。裂解红细胞后直接用完全 1640 培养基将细胞重悬放入 24 孔细胞培养板中,同时设置阴性对照孔,向需检测 IFN-γ 的孔中添加 PHA 至终浓度 5 μg/mL;向需检测 TNF-α 的孔中添加 LPS 至终浓度 100 ng/mL。将细胞放入培养箱中刺激 24 h,在细胞刺激结束前 4 h,分别向每孔中加入 Golgi stop(1∶1 000),Golgi plug (1∶1 000),DNAase(1∶1 000),继续培养至时间满。刺激结束以 FACS 液洗涤 2 次后向需检测 IFN-γ 的悬液中加入 APC 标记的 anti-rat CD3 抗体、PE-cy7 标记的 anti-rat CD8 抗体、APC-cy7 live/dead dye、PB 标记的 anti-rat CD4 抗体;向需检测 TNF-α 的悬液中加入 PerCP 标记的 anti-rat CD11b 抗体、FITC 标记的 anti-rat MHC-Ⅱ(HLA-DR)抗体、APC-cy7 live/dead dye。冰上孵育 30 min 经 Transcription Factor Buffer Set 打孔后根据组别分别加入 PE 标记的 anti-rat TNFα 抗体及 PB 标记的 anti-rat IFNγ 抗体,冰上培养 40~50 min 后用流式细胞仪检测 TNF-α 及 IFN-γ 表达情况。

1.7 统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图,各组间比较采用单因素方差分析,并进一步采用 LSD 法对各组间有差异的指标进行两两比较,数据分析时首先进行正态性分布检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 白细胞(WBC)、血小板(PLT)、淋巴细胞(LYMPH)、中性粒细胞(NEUT)计数结果

由表 1 可见,TPN 组幼鼠 LYMPH 相较于正常组

与对照组幼鼠均减少($P<0.05$),PLT 增高($P<0.05$),WBC、NEUT 各组间差异无统计学意义。

表 1　3 组幼鼠 WBC、PLT、LYMPH、NEUT 值分析结果($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	WBC(10^9/L)	PLT(10^9/L)	LYMPH(10^9/L)	NEUT(10^9/L)
正常组	10.87±1.45	844.17±91.52	2.45±0.79	7.15±1.42
对照组	11.49±1.42	804.33±45.26	2.36±0.71	8.44±1.48
TPN 组	10.82±2.48	1 074.17±198.42	1.36±0.86	6.17±2.57
F	0.702	7.669	3.564	2.169
P	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05

2.2　脾脏细胞中的 HLA-DR 表达情况

如图 1 所示,相较于正常组与对照组,TPN 组幼鼠脾脏细胞 HLA-DR 的表达明显减低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　外周血 Treg 细胞水平

如图 2 所示,相较于正常组与对照组,TPN 组幼鼠 Treg 细胞的百分比明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。如图 3 所示:相较于正常组与对照组,TPN 组幼鼠外周血 $CD4^+T$ 及 $CD8^+T$ 淋巴细胞晚期凋亡均增加($P<0.05$),而早期凋亡各组间无明显区别,差异无统计学意义。

2.4　内毒素诱导单核细胞产生 TNF-α 以及淋巴细胞($CD4^+T$)经 PHA 刺激后产生 IFN-γ 的能力

外周血单核细胞经内毒素刺激后与正常组及对照组相比,TPN 组产生的 TNF-α 所占比例明显降低($P<0.05$,图 4),而 $CD4^+T$ 淋巴细胞经 PHA 刺激后所产生 IFN-γ 的百分比也明显减少(图 5),差异均有统计学意义($P<0.05$)。

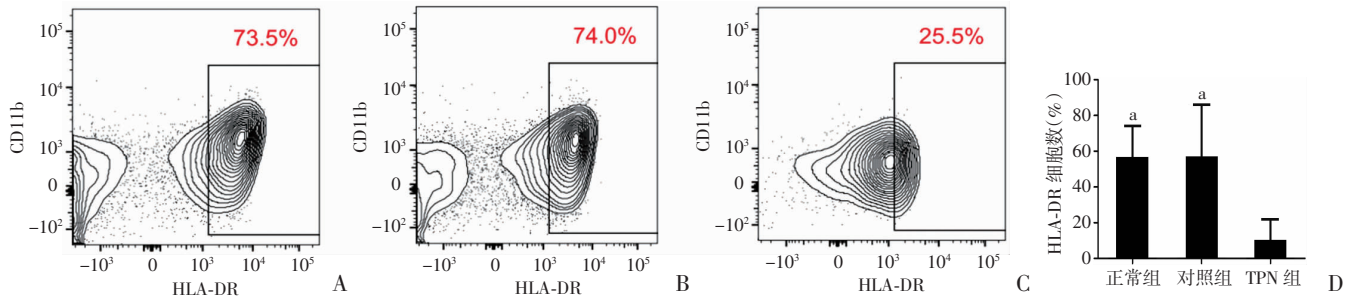
2.5　血浆中 IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4 水平

如表 2 所示:与正常组及对照组幼鼠相比,TPN 组幼鼠炎症因子 IL-1β、TNF-α 表达水平明显增加($P<0.05$),而抗炎因子 IL-10、IL-4 的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示 TPN 促进了炎症反应并抑制了抗炎反应。

表 2　3 组幼鼠模型中炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4 水平比较($n=6$,pg/mL,$\bar{x}\pm s$)

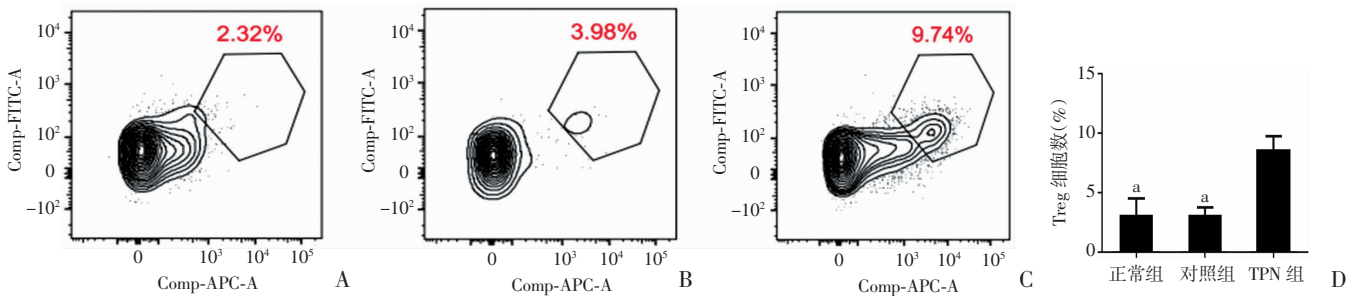
组别	IL-1β	TNF-α	IL-4	IL-10
正常组	45.34±7.45[a]	36.73±2.97[a]	19.22±1.26[a]	92.72±24.58[a]
对照组	47.05±7.82[a]	38.67±1.42[a]	18.23±2.02[a]	94.59±6.19[a]
TPN 组	73.60±6.21	47.82±2.23	13.58±2.87	71.32±4.45

a:$P<0.05$,与 TPN 组比较



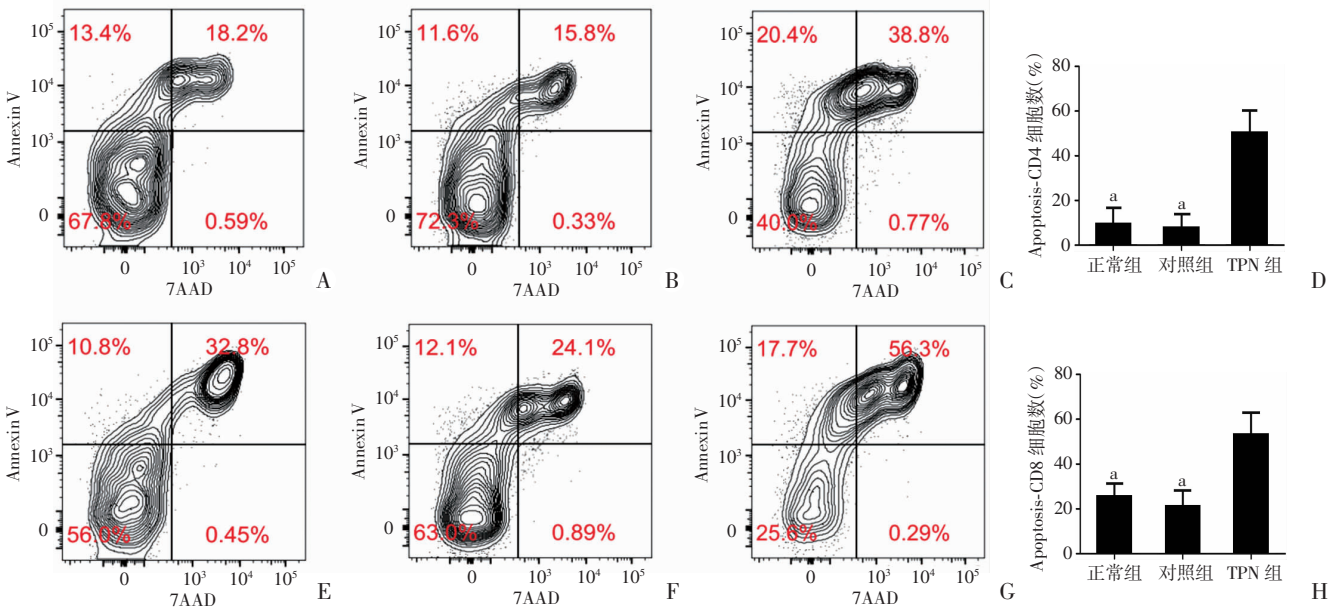
A~C:分别为正常组、对照组、TPN 组流式细胞术结果;D:HLA-DR 细胞占比的比较　a:$P<0.05$,与 TPN 组比较

图 1　3 组幼鼠脾脏细胞中的 HLA-DR 表达情况



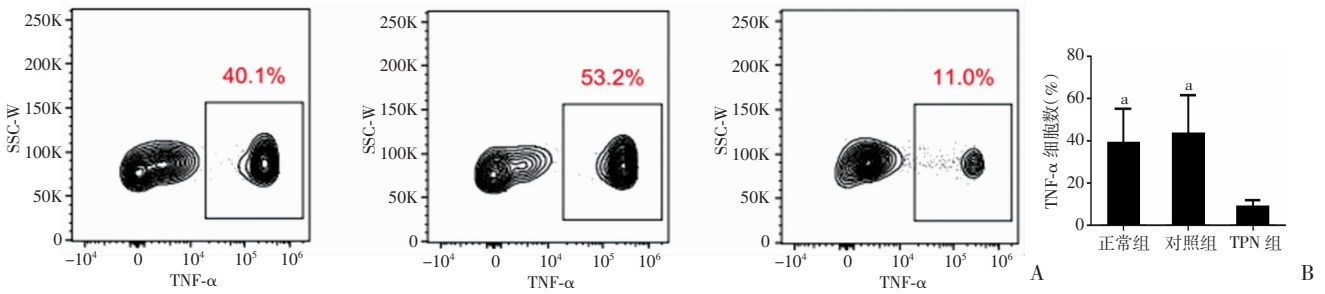
A~C:分别为正常组、对照组、TPN 组流式细胞术结果;D:Treg 细胞占比的比较　a:$P<0.05$,与 TPN 组比较

图 2　3 组幼鼠外周血 Treg 细胞比例



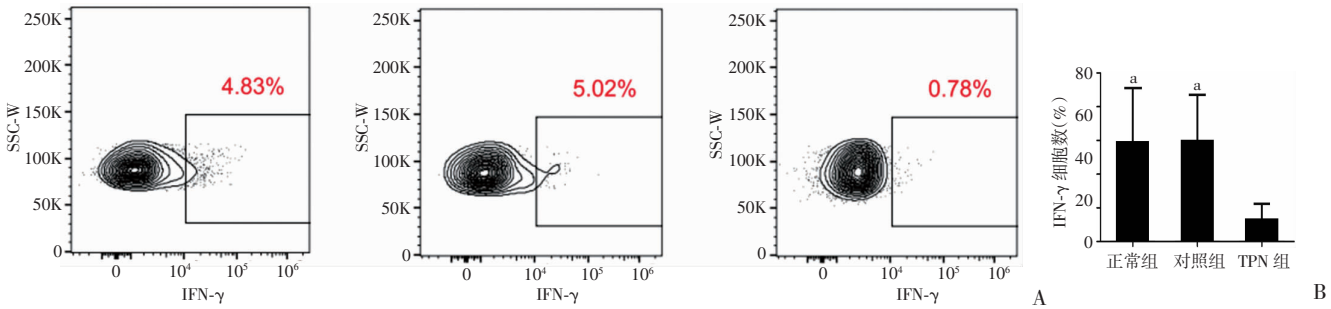
A~D:分别为正常组、对照组、TPN 组 $CD4^+$淋巴细胞流式细胞术结果与细胞凋亡比较;E~H:分别为正常组、对照组、TPN 组 $CD8^+$淋巴细胞流式细胞术结果与细胞凋亡比较　a:$P<0.05$,与 TPN 组比较

图 3　3 组幼鼠外周血 T 淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$)凋亡情况



A:流式细胞仪结果;B:TNF-α 细胞占比的比较　a:$P<0.05$,与 TPN 组比较

图 4　3 组幼鼠外周血单核细胞经内毒素诱导后产生 TNF-α 的能力



A:流式细胞仪结果;B:IFN-γ 细胞占比的比较　a:$P<0.05$,与 TPN 组比较

图 5　3 组幼鼠外周血 T 淋巴细胞($CD4^+$)用 PHA 刺激后产生 IFN-γ 的能力

3　讨论

TPN 作为重要的治疗手段已在临床上广泛应用并成为挽救部分危重患者生命的重要治疗方式,但长时间 TPN 的使用会出现许多并发症,院内感染是其重要的并发症之一。文献[7]报道 207 例接受 PN 治疗的儿童中院内感染发生率为 5.5%,与未暴露于 PN 的住院患儿相比,风险差为 4.1%(95%*CI*:3.4%~4.9%)。

NETTO 等[8]对在 PICU 住院的 1106 例患儿进行的前瞻性观察研究发现,92 例(8.3%)患儿出现院内感染,而 PN 天数是其独立危险因素,并可成为院内感染最重要的预测因素之一。然而,TPN 增加感染风险的确切机制尚未完全阐明,国内尚少见相关报道,本研究通过构建 TPN 幼鼠动物模型,探讨了 TPN 对幼鼠先天性及获得性免疫功能及炎症反应的影响。

3.1 TPN 可导致幼鼠先天性免疫功能受损

本研究发现 HLA-DR 在 TPN 组的表达明显下降。HLA-DR 的表达被认为是反映先天免疫功能最特征性的指标之一[9]。HLA-DR 系 MHC II 类细胞表面分子,是一种糖基化细胞表面跨膜蛋白,表达于 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、活化 T 淋巴细胞、活化 NK 淋巴细胞和人祖细胞上。单核巨噬细胞表面的 HLA-DR 是外来抗原提呈过程中最重要的分子,单核细胞上 HLA-DR 的表达(mHLA-DR)对于将来自摄入微生物的多肽逞递给 CD4 或 CD8 阳性 T 细胞从而启动消除潜在病原体的特异性免疫应答来说至关重要,当病原微生物入侵时,细胞活化表达 HLA-DR/CD14,并通过 HLA-DR 的协助将有效抗原成分传递给淋巴细胞,T 淋巴细胞通过 TCR 识别阳性细胞表面的 HLA-DR 分子后提供第一刺激信号,从而启动 T 细胞活化增殖,机体即呈现免疫应答并促进免疫反应过程完成,同时,HLA-DR 通过激活辅助性 T 淋巴细胞在针对感染的特异性免疫应答中发挥核心作用[10]。NAVIN 等[11]发现 PICU 危重患儿所有单核细胞亚群中 HLA-DR 表达均降低,并在住院期间进一步下降,入院后第 2 天和第 3 天单核细胞 HLA-DR 水平降低与院内感染发生率和患儿死亡率增加呈显著负相关。

LPS 诱导 TNF-α 产生的能力被用作危重疾病中评估单核细胞功能的第 2 个生物标志物[12],我们的研究发现:TPN 组幼鼠外周血单核细胞经内毒素诱导后产生 TNF-α 的能力降低。因 LPS 刺激外周血单核细胞上的 toll 样受体(TLR)-4 复合物可以诱导 TNF-α 的快速转录、翻译和释放,反映的不是血浆中循环 TNF-α 的水平,而是患儿外周血产生 TNF-α 的能力,其与脓毒症、MODS、创伤及体外循环的不良结局密切相关[13-15],单核细胞经 LPS 刺激后产生 TNF-α 的能力越低医院感染及死亡风险越高[16-17]。文献[18]对 76 例 PICU 危重患儿的研究发现,在发生院内感染的 16 例患儿中其体外 LPS 诱导产生 TNF-α 的能力均较低。肠道是人体最大的免疫器官,存在着人体 70%以上的淋巴细胞,是与抗原接触的最大区域,也是全身炎症反应的启动、动力、中心器官,受到肠道微生物群的调控。在 TPN 治疗下因长时间没有肠内营养的刺激,肠道蠕动不足,肠道内微生物群的组成和功能发生改变,由正常肠内营养下占优势的厚壁菌门转变为拟杆菌门,厚壁菌门与拟杆菌门细菌比例失调。拟杆菌门细菌可促进肠道炎症,增加肠道通透性,有利于细菌穿过黏膜屏障[19]。正常胃肠内营养下一方面肠道微生物群的代谢产物,如蛋白质和多糖,可以通过激活模式识别受体刺激黏膜免疫系统;另一方面肠道菌群可以促进肠黏膜免疫耐受(如刺激淋巴细胞,减少 NF-kB 信号通路等),防止细菌过度生长[20]。因此,TPN 治疗过程中微生物群的变化是免疫反应和内毒素介导的全身炎症的驱动因素[21]。

3.2 TPN 可导致幼鼠获得性免疫功能受损

我们的研究还发现 Treg ($CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ T)细胞在 TPN 组大鼠外周血呈高表达状态。Treg($CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ T)细胞的主要功能是抑制创伤或脓毒症后 T 细胞的增殖,抑制保护性 Th1 型细胞因子的产生,在维持促炎反应和抗炎反应之间的平衡中扮演着重要的角色,如果 Treg 的负性免疫调节作用占优势,将导致免疫抑制状态。Treg 细胞可以通过抑制 T 细胞的增殖和干扰保护性 Th1 型细胞因子(如 IL- 10)的产生发挥免疫抑制作用[22]。IL-10 是促进 Treg 细胞分化和维持其功能的主要因子,由肠道的巨噬细胞产生,受肠内营养素的调节,TPN 可导致小肠中产生 IL-10 的巨噬细胞数量明显下降,可能是导致 Treg 细胞比例增加的重要机制,同时 TPN 可促进微生物群向更具有免疫原性的表型(富含 TLR 配体的变形菌门)转变,也可能是 Treg 细胞比例增加的重要机制[20]。

除此之外,本研究还发现 TPN 组幼鼠外周血淋巴细胞绝对值降低、T 淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$T)晚期凋亡明显增多和淋巴细胞($CD4^+$T)经 PHA 刺激后产生 IFN-γ 的能力减弱。淋巴细胞凋亡增加能通过减少免疫效应细胞的数量参与免疫抑制[23]。有研究表明[24],创伤患者的外周血淋巴细胞呈下降趋势,在第 3 天时达最低,而在发生感染或死亡患者中淋巴细胞数量明显减少,此外,淋巴细胞计数减少超过 3 d 的重症患者发生院内感染的风险也会明显增加[25]。TPN 导致淋巴细胞凋亡增加以及数量减少可能与肠道缺乏营养素刺激,肠道完整性受到破坏,导致细菌和(或)内毒素移位,从而加重全身炎症有关[26]。同时,我们发现 TPN 组幼鼠外周血淋巴细胞反应性也降低,即当淋巴细胞与其刺激物 PHA 在体外孵育时,其产生 IFN-γ 的能力降低,表明获得性免疫受到抑制,成为在临床上危重患者感染并发症及死亡率增加的重要原因[27-28]。

3.3 TPN 可促进炎症反应并抑制抗炎反应

本实验还进一步观察了 TPN 对炎症因子的影响,实验结果显示 TPN 组幼鼠外周血炎症因子 TNF-α、IL-1β 增高而抗炎因子 IL-4、IL-10 降低,这可能是诱导免疫损伤的重要机制。TPN 诱导炎症反应不仅与肠道菌群改变有关,还与脂质类型有关,传统的肠外营养脂质乳剂主要为大豆油,由 ω-3 脂肪酸、ω-6 脂肪酸、α-亚麻酸等组成,在人体中,ω-6 脂肪酸通过延长酶和去饱和酶的作用转化为花生四烯酸,花生四烯酸在体内可转变成各种代谢产物,如前列腺素(PGs)、血栓烷(TXs)、5-羟基二十烷四烯酸(HETE)和白三烯(lt)等,参与炎症、免疫抑制和血栓形成等[29]。脂肪乳剂中 ω-6 多不饱和脂肪酸是否增加炎症目前尚存争议,但当 ω-6 /ω-3 比例较高时,具有明显的促炎作用。

综上,我们的研究证实 2 周的 TPN 可导致幼鼠免疫功能受损,表现为先天性和获得性免疫功能均有所减弱,炎症反应明显增强,可能是临床上 TPN 增加感染发生率重要分子机制。因此,尽可能减少 TPN 使用时间,尽早开始肠内营养,具有重要的临床意义,然而 TPN 导致免疫功能受损的具体分子机制仍不完全清楚,尚待我们在今后的工作中深入研究。

参考文献:

[1] NAKAYAMA D K. The development of total parenteral nutrition[J]. Am Surg, 2017, 83(1): 36-38.

[2] PATEL P, BHATIA J. Total parenteral nutrition for the very low birth weight infant[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2017, 22(1): 2-7. DOI:10.1016/j.siny.2016.08.002.

[3] DEL MORAL T. Nosocomial infections in premature infants, where are we going?[J]. An Pediatr (Engl Ed), 2019, 91(1): 1-2. DOI:10.1016/j.anpedi.2019.02.012.

[4] 张德双,谢东可,何娜,等. 极早产儿医院内感染的病原分布及其危险因素的结局分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2017,19(8): 866-871. DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2017.08.005.
ZHANG D S, XIE D K, HE N, *et al*. Pathogen distribution, risk factors, and outcomes of nosocomial infection in very premature infants[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2017, 19(8): 866-871. DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2017.08.005.

[5] YANG J, SUN H, WAN S, *et al*. Prolonged parenteral nutrition is one of the most significant risk factors for nosocomial infections in adult patients with intestinal failure[J]. Nutr Clin Pract, 2020, 35(5): 903-910. DOI:10.1002/ncp.10483.

[6] HODIN C M, VISSCHERS R G, RENSEN S S, *et al*. Total parenteral nutrition induces a shift in the Firmicutes to Bacteroidetes ratio in association with Paneth cell activation in rats[J]. J Nutr, 2012, 142(12): 2141-2147. DOI:10.3945/jn.112.162388.

[7] EGBERG M D, GALANKO J A, BARNES E L, *et al*. Thrombotic and infectious risks of parenteral nutrition in hospitalized pediatric inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2019, 25(3): 601-609. DOI:10.1093/ibd/izy298.

[8] NETTO R, MONDINI M, PEZZELLA C, *et al*. Parenteral nutrition is one of the most significant risk factors for nosocomial infections in a pediatric cardiac intensive care unit[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2017, 41(4): 612-618. DOI:10.1177/0148607115619416.

[9] SHANKER A, THOUNAOJAM M C, MISHRA M K, *et al*. Innate-adaptive immune crosstalk[J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 982465. DOI:10.1155/2015/982465.

[10] ZHUANG Y, PENG H, CHEN Y, *et al*. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of Sepsis[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2017, 22: 1344-1354. DOI:10.2741/4547.

[11] BOEDDHA N P, KERKLAAN D, DUNBAR A, *et al*. HLA-DR expression on monocyte subsets in critically ill children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2018, 37(10): 1034-1040. DOI:10.1097/INF.0000000000001990.

[12] HALL M W, KNATZ N L, VETTERLY C, *et al*. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(3): 525-532. DOI:10.1007/s00134-010-2088-x.

[13] BORTOLOTTI P, FAURE E, KIPNIS E. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1900. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01900.

[14] DELANO M J, WARD P A. The immune system's role in Sepsis progression, resolution, and long-term outcome[J]. Immunol Rev, 2016, 274(1): 330-353. DOI:10.1111/imr.12499.

[15] MILLAR J E, FANNING J P, MCDONALD C I, *et al*. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology[J]. Crit Care, 2016, 20(1): 387. DOI:10.1186/s13054-016-1570-4.

[16] MIRA J C, GENTILE L F, MATHIAS B J, *et al*. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome[J]. Crit Care Med, 2017, 45(2): 253-262. DOI:10.

1097/CCM.0000000000002074.

[17] PATIL N K, BOHANNON J K, SHERWOOD E R. Immunotherapy: a promising approach to reverse Sepsis-induced immunosuppression[J]. Pharmacol Res, 2016, 111: 688-702. DOI:10.1016/j.phrs.2016.07.019.

[18] MUSZYNSKI J A, NOFZIGER R, GREATHOUSE K, *et al*. Innate immune function predicts the development of nosocomial infection in critically injured children[J]. Shock, 2014, 42(4): 313-321. DOI: 10.1097/shk.0000000000000217.

[19] MADNAWAT H, WELU A L, GILBERT E J, *et al*. Mechanisms of parenteral nutrition-associated liver and gut injury[J]. Nutr Clin Pract, 2020, 35(1): 63-71. DOI: 10.1002/ncp.10461.

[20] CAHOVA M, BRATOVA M, WOHL P. Parenteral nutrition-associated liver disease: the role of the gut microbiota[J]. Nutrients, 2017, 9(9): 987. DOI: 10.3390/nu9090987.

[21] CHANDRA SHEKHARA M, VAN N J, VIDUL M, *et al*. Role of bile acids and gut microbiota in parenteral nutrition associated injury[J]. J Hum Nutr, 2020, 4(1). DOI:10.36959/487/286.

[22] SHI Z W, LIU Y, XU Y, *et al*. Tremella Polysaccharides attenuated Sepsis through inhibiting abnormal $CD4^+$ CD25 (high) regulatory T cells in mice[J]. Cell Immunol, 2014, 288(1/2): 60-65. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.02.002.

[23] GIRARDOT T, RIMMELÉ T, VENET F, *et al*. Apoptosis-induced lymphopenia in Sepsis and other severe injuries[J]. Apoptosis, 2017, 22(2): 295-305. DOI: 10.1007/s10495-016-1325-3.

[24] THAKKAR R K, DILTZ Z, DREWS J D, *et al*. Abnormal lymphocyte response after pediatric thermal injury is associated with adverse outcomes[J]. J Surg Res, 2018, 228: 221-227. DOI:10.1016/j.jss.2018.03.039.

[25] ALKAN OZDEMIR S, ARUN OZER E, ILHAN O, *et al*. Can neutrophil to lymphocyte ratio predict late-onset Sepsis in preterm infants?[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(4): e22338. DOI:10.1002/jcla.22338.

[26] THAISS C A, ZMORA N, LEVY M, *et al*. The microbiome and innate immunity[J]. Nature, 2016, 535(7610): 65-74. DOI:10.1038/nature18847.

[27] BOOMER J S, TO K, CHANG K C, *et al*. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure[J]. JAMA, 2011, 306(23): 2594-2605. DOI:10.1001/jama.2011.1829.

[28] MUSZYNSKI J A, NOFZIGER R, GREATHOUSE K, *et al*. Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study[J]. Crit Care, 2014, 18(4): R145. DOI:10.1186/cc13980.

[29] CALDER P C, WAITZBERG D L, KLEK S, *et al*. Lipids in parenteral nutrition: biological aspects[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2020, 44(Suppl 1): S21-S27. DOI:10.1002/jpen.1756.

(收稿:2021-05-11;修回:2021-07-14)

(编辑 栗 嘉)