基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000974

T淋巴细胞凋亡在脓毒症患者免疫抑制和预后中的作用

桂海波[1]，杜晓刚[2]，陈雪梅[1]

（重庆医科大学附属第一医院 1. 急诊科；2. 肾内科，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：研究脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 T 淋巴细胞凋亡的变化，探讨其在免疫抑制和预后中的作用。**方法**：收集 2014 年 10 月至 2015 年 12 月重庆医科大学附属第一医院 ICU 收治的脓毒症患者 55 例，随访患者 28 d 生存率，根据预后不同，分为脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组；同时收集健康志愿者 30 例为对照组。应用流式细胞仪检测患者外周血 T 细胞亚群计数，分析其与 APACHEⅡ评分及预测死亡危险率（R）的相关性；用免疫磁珠分选外周血 $CD3^+$T 淋巴细胞，通过流式细胞技术和 Tunel 法检测细胞凋亡。用脓毒症患者和健康志愿者血清体外刺激 Jurkat 细胞 24 h，采用流式细胞技术和 Tunel 染色法检测细胞凋亡，Western blot 法检测激活型天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶（cleaved-caspase 3），B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）和髓样细胞白血病-1（myeloid cell leukemia 1，Mcl-1）蛋白表达水平。**结果**：脓毒症患者存活组、死亡组 T 淋巴细胞各亚群绝对值计数均明显低于对照组，分别为：CD3+ 374.0（274.5~514.0）、154.0（87.5~256.2）、1534.5（1255.0~1756.7），$CD3^+CD4^+$ 198.0（148.5~299.0）、68.0（37.7~108.5）、766.5（629.3~923.5），$CD3^+CD8^+$ 142.0（89.0~184.0）、76.0（48.7~134.5）、600.5（400.2~717.0）（全部 $P<0.05$）；脓毒症患者死亡组 $CD3^+$、$CD3^+CD4^+$细胞计数减少均较脓毒症患者存活组更显著，差异具有统计学意义（$P=0.011$，$P=0.005$）。脓毒症患者死亡组外周血 T 淋巴细胞中 $CD3^+CD4^+$细胞占（42.40 ± 5.71）%，较对照组（53.46 ± 9.28）%明显减少（$P=0.003$）；$CD3^+CD8^+$细胞占（54.40 ± 4.76）%，较对照组（39.33 ± 7.26）%增加（$P=0.003$）；$CD4^+/CD8^+$比值为（0.79 ± 0.17），较对照组（1.44 ± 0.51）明显下降（$P=0.023$）。$CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$比值与患者 APACHE Ⅱ评分和 R 均呈负相关关系（全部 $P<0.05$）。脓毒症患者存活组、死亡组 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡率分别为（15.59 ± 0.54）%、（39.57 ± 4.49）%，较对照组（9.53 ± 1.91）%明显增加（$P=0.040$，$P=0.000$），脓毒症患者死亡组较脓毒症患者存活组增加更明显（$P=0.000$）。脓毒症患者存活组、死亡组血清诱导 Jurkat 细胞凋亡率分别为（16.60 ± 3.55）%、（32.93 ± 5.89）%，较对照组（8.56 ± 0.89）%明显增加（$P=0.049$、$P=0.000$）；Cleaved-caspase3 蛋白水平（2.01 ± 0.21，2.68 ± 0.28）较对照组（1.00 ± 0.00）上调（$P=0.001$、$P=0.000$）；抗凋亡蛋白 Mcl-1（0.77 ± 0.03，0.61 ± 0.01）、Bcl-2（0.68 ± 0.07，0.48 ± 0.03）较对照组（1.00 ± 0.00）明显下调（$P=0.000$、$P=0.000$）（$P=0.000$、$P=0.000$）；与脓毒症患者存活组比较，脓毒症患者死亡组中 Jurkat 细胞凋亡、Cleaved-caspase3、Mcl-1、Bcl-2 变化更加为明显（$P=0.002$、$P=0.007$、$P=0.000$、$P=0.001$）。**结论**：脓毒症患者免疫失衡，T 淋巴细胞凋亡增加，T 淋巴细胞数明显减少，发生免疫抑制，且与病情严重程度和预后密切相关。

【关键词】脓毒症；T 淋巴细胞；凋亡；免疫抑制；预后

【中图分类号】R515.3；R631 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-03-20

Role of T lymphocytes apoptosis in immunosuppression and prognosis of sepsis

Gui Haibo[1], *Du Xiaogang*[2], *Chen Xuemei*[1]

(*1. Department of Emergency; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate changes of T lymphocyte subsets and T lymphocytes apoptosis in sepsis and to discuss its role in immunosuppression and prognosis. ***Methods***: Totally 55 sepsis patients from Intensive Care Unit of The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from October 1, 2014 to December 31, 2015, were enrolled. Sepsis patients were divided into survival group and death group according to their prognosis. The APACHE Ⅱ score was calculated and the risk of death(R) was predicated according to APACHE Ⅱ score, and the survival rate of 28 days were followed up. The absolute counts of peripheral blood T-lymphocyte subsets were measured by flow cytometry; T-lymphocyte apoptosis were detected by flow cytometry and TUNEL

作者介绍：桂海波，Email：422970362@qq.com，研究方向：脓毒症免疫。

通信作者：陈雪梅，Email：cqmudxg@163.com。

基金项目：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：81202318）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1638.094.html（2016-05-13）

assay. Immortalized line of human T lymphocyte cells(Jurkat) was cultured and cells were treated with serum from sepsis patients or healthy control subjects,then apoptosis was measured by flow cytometry and TUNEL assay. Cleaved-caspase 3,B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and myeloid cell leukemia 1(Mcl-1) expressions were detected by Western blot analysis. ***Results***:Absolute counts of peripheral blood T lymphocyte subsets in survival group and death group were decreased as compared with those in control group:$CD3^+$ cell counts were respectively 374.0(274.5-514.0),154.0(87.5-256.2),1534.5(1255.0-1756.7);$CD3^+CD4^+$ cell counts were respectively 198.0(148.5-299.0),68.0(37.7-108.5),766.5(629.3-923.5);$CD3^+CD8^+$ cell counts were respectively 142.0(89.0-184.0),76.0(48.7-134.5),600.5(400.2-717.0)($P<0.05$). Compared with those in survival group,$CD3^+$ and $CD3^+CD4^+$ cell counts decreased more obviously in death group($P=0.011$,$P=0.005$). $CD3^+CD4^+$ proportion was lower in death group(42.40 ± 5.71)% than in control group (53.46 ± 9.28)%;$CD3^+CD8^+$ proportion was obviously higher in death group(54.40 ± 4.76)% than in control group(39.33 ± 7.26)%; $CD4^+/CD8^+$ ratio was significantly lower in death group(0.79 ± 0.17) than in control group(1.44 ± 0.51)($P=0.003$,$P=0.003$,$P=0.023$). $CD3^+$,$CD3^+CD4^+$,$CD3^+CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ ratio exhibited a negative relationship with APACHE Ⅱ score and predicted risk of death score(R)($P<0.05$). $CD3^+$ T-lymphocyte apoptosis ratio in survival group(15.59 ± 0.54)% and death group(39.57 ± 4.49)% both increased as compared with that in control group(9.53 ± 1.91)%($P=0.040$,$P=0.000$). Apoptosis ratio of $CD3^+$ T-lymphocyte in death group increased more obviously than that in survival group($P=0.000$). Apoptosis ratio of Jurkat cell induced by serum from survival group(16.60 ± 3.55)% and death group(32.93 ± 5.89)% both increased obviously as compared with that in control group (8.56 ± 0.89)%($P=0.049$,$P=0.000$). Protein expressions of Cleaved-caspase 3 in survival group(2.01 ± 0.21) and death group(2.68 ± 0.28) were obviously higher than those in control group($P=0.001$,$P=0.000$). Mcl-1 expressions in survival group(0.77 ± 0.03) and death group(0.61 ± 0.01) were lower than those in control group($P=0.000$,$P=0.000$). Bcl-2 expressions in survival group(0.68 ± 0.07) and death group(0.48 ± 0.03) were lower than those in control group($P=0.000$,$P=0.000$). Compared with those in survival group,the changes of apoptosis rate,Cleaved-caspase3,Mcl-1 and Bcl-2 in Jurkat cell were more obvious in death group($P=0.002$, $P=0.007$,$P=0.000$,$P=0.001$). ***Conclusion***:Declined T-lymphocyte cell counts and increased T lymphocyte apoptosis induce immunosuppression in sepsis,which are related to the severity of illness and prognosis.

【Key words】sepsis;T lymphocyte cell;apoptosis;immunosuppression;prognosis

脓毒症是由感染的宿主反应失控导致的致命性器官功能障碍，病死率超过 40%，尽管经过规范化治疗后脓毒症死亡率有所下降，但脓毒症所导致的脓毒性休克死亡率仍可高达 40%以上，是急危重症患者的主要死因之一[1-2]。引起脓毒症的发病机制非常复杂，包括宿主因素、病原微生物及其毒力因素以及机体的免疫功能紊乱等多方面。目前认为过度增强的促炎反应(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)/代偿性抗炎反应(compensatory anti-inflammatory response syndrome,CARS)和免疫稳态失衡是脓毒症致病过程的主要机制[3]。而 T 淋巴细胞作为构成人体细胞免疫的重要组成部分，在参与细胞免疫、免疫调理以及全身炎症反应中都发挥有重要作用，T 淋巴细胞凋亡则在免疫应答终止、免疫稳态和 SIRS/CARS 的维持中起着关键作用[4-6]。近年来大量的研究发现，在脓毒症患者中存在不同程度的免疫功能受损和免疫抑制[7]。与早期的炎性反应相比，80%以上的脓毒症患者死于低免疫状态的感染[8]，因此，免疫抑制是脓毒症患者预后不良的重要因素。但是关于 T 淋巴细胞的凋亡是否在脓毒症患者发生免疫抑制中具有重要作用，目前仍有待于进一步研究。本文拟通过体内外实验，观察脓毒症患者外周血 $CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ T 细胞亚群的变化以反映机体的免疫抑制状况，同时检查脓毒症患者 T 淋巴细胞凋亡的变化，以探讨 T 淋巴细胞凋亡在脓毒症患者免疫抑制及其预后影响中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 10 月 1 日至 2015 年 12 月 31 日重庆医科大学附属第一医院 ICU 收治的脓毒症患者 55 例，其中男性 28 例，女性 27 例，年龄 19~89(62.73 ± 15.58)岁。随访脓毒症患者 28 d 生存率，根据预后不同，分为脓毒症患者存活组(45 例)和脓毒症患者死亡组(10 例)。选择同期年龄、性别相近的健康志愿者 30 例为对照组，其中男性 15 例，女性 15 例，年龄 31~88(59.77 ± 16.41)岁。脓毒症患者存活组、死亡组和对照组的年龄、性别构成比无统计学差异($P>0.05$)(表 1)。脓毒症患者纳入标准：①年龄>18 岁；②符合美国危重病医学会(SCCM)《严重脓毒症与脓毒性休克治疗国际指南(2012年)》

的诊断标准[9]。排除标准：①患有恶性肿瘤、再生障碍性贫血，自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病、变态反应性疾病者；② 半年内使用放、化疗，免疫抑制剂者。

1.2 研究对象外周血标本采集及处理

所有患者均于确诊脓毒症当天抽取外周静脉抗凝血（EDTA-K2 抗凝）10 ml，进行 T 淋巴细胞亚群计数及 T 淋巴细胞凋亡的检测；同时采集外周静脉血 10 ml，3 000 r/min 离心 20 min，分离血清，-80 ℃冰箱保存备用。

1.3 脓毒症患者临床预后评估

收集确诊脓毒症当天 24 h 内最差生理指标包括（体温、心率、呼吸、血压），生化指标（血钾、血钠、Cr、Hct、WBC），血气指标（PaO_2、$PaCO_2$、pH、FiO_2）及患者年龄和慢性疾病情况，进行 APACHE Ⅱ 评分。并根据 APACHE Ⅱ 评分计算患者的预测死亡危险率（R）。预测死亡危险率 R 计算公式为：ln(R/1-R)=-3.517+(APACHE Ⅱ 评分 × 0.146)+(0.603，若为急诊手术)+(诊断分类系数)。随访患者 28 d 生存率。见表 1。

表 1 脓毒症患者基本资料

Tab.1 Clinical characteristics of sepsis patients

组别	n	年龄	APACHE Ⅱ 评分	预测死亡危险率（%）
对照组	30	59.77 ± 16.41	-	-
存活组	45	62.49 ± 14.81	20.11 ± 6.89	34.29 ± 25.71
死亡组	10	63.80 ± 19.55	34.30 ± 6.70[a]	75.48 ± 15.94[a]
F 值		0.361	34.969	23.455
P 值		0.698	0.000	0.000

a：P=0.000 vs. 脓毒症患者存活组；-；无相关数据

1.4 外周血 T 淋巴细胞亚群计数

从研究对象的血标本中取两份 100 μl 抗凝血，分别加入 10 μl 荧光标记的单克隆抗体 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 或同型对照，混匀，室温避光孵育 20~30 min。加入 2 ml 1 × RBC Lysis Buffer，摇匀后室温避光孵育 10 min。1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 重悬 2 次。④流式细胞仪检测$CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$的绝对值。

1.5 外周血 $CD3^+$T 淋巴细胞分选

EasySep 正选人 CD3 试剂盒（Stem Cell 公司），按照说明书进行分选：收集 4.5 ml 肝素抗凝的全血转移至 14 ml 的聚乙烯管内。等体积加入 1 × RBC Lysis Buffer，混匀。加 EasySep® 阳性选择混合物 25 μl /ml，混匀，室温孵化 15 min。加入磁珠（25 μl/ml）混匀，室温孵化 10 min。混合管中细胞，吹打 2、3 次后把试管放入磁极中静置 5 min，弃上清。离开磁极，加入 10 ml 1×PBS，吹洗 2、3 次后再将试管放回磁极中，静置 5 min。用 PBS 重悬细胞，流式细胞仪鉴定和检测细胞纯度。

1.6 Jurkat 细胞的体外培养和处理

Jurkat 细胞置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中，用含 10%胎牛血清（美国 Gibco），1%青-链霉素的 RPMI1640（美国 Gibco）培养，待对数期生长的细胞生长至适宜密度，更换为无血清培养基，分别加入 10%的脓毒症患者死亡组、存活组血清和健康对照组血清刺激细胞 24 h，收集细胞做如下处理。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞处理结束后，PBS 清洗 2 次，将细胞重悬于 300 μl PBS 中，送重庆医科大学生命科学院用流式细胞仪检测细胞凋亡（采用 FITC-Annexin V/PI 双染法）。

1.8 Western blot 法检测蛋白的表达

细胞处理结束后，收取蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度后进行电泳，转膜 1 h，5%脱脂奶粉封闭 2 h。一抗工作浓度分别为 Cleaved-caspase3（1:1 000）（美国 Abcam），Bcl-2（1:1 000）（美国 Abcam），Mcl-1（1:1 000）（美国 Abcam），β-actin（1:5 000）（美国 Sigma），4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，ECL 化学发光试剂盒（美国 Pierce）显色，曝光，保存图片。使用 Fusion 软件进行定量分析，对照组标化为“1”。实验重复 3 次。

1.9 Tunel 法检测细胞凋亡

Tunel 试剂盒购自美国 Intergen，按说明书操作。4%多聚甲醛溶液固定细胞 30 min。内源性过氧化物酶的阻断和细胞的通透：PBS 洗片后，用阻断剂（0.3%H_2O_2 甲醇溶液）室温孵育 30 min，再用 TritonX-100 通透 2 min。标记：PBS 冲洗后加 50 μl Tunel 反应混合溶液，在湿盒中 37 ℃孵育 1 h。信号转化和分析：PBS 冲洗后加入 50 μl 转化剂，在湿盒中 37 ℃孵育 30 min，PBS 冲洗 3 次，加入 50~100 μl DAB 底物溶液，室温孵育 10 min。PBS 冲洗后用 DAPI 染核，抗荧光淬灭剂封片，荧光显微镜下采集图像。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料正态分布检验采用 Komlogorov-Smirnov Normality，符合正态分布用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，方差齐者两组间比较采用独立样本 t 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较方差齐采用 LSD-t 检验，偏态分布用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示，非参数检验多个独立样本采用 Kruskal-Wallis 检验，相关性分析采用 Spearman 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 脓毒症患者 T 淋巴细胞亚群变化

本文发现，与对照组比较，在全部脓毒症患者，包括脓毒症患者存活组和死亡组其外周血总 T 淋巴细胞（$CD3^+$）、辅助性（$CD3^+CD4^+$）T 细胞及抑制性（$CD3^+CD8^+$）T 细胞都明显减少（P=0.000）；而且脓毒症患者死亡组中其总 T 淋巴细胞（P=0.011）、辅助性淋巴细胞（P=0.005）减少较脓毒症患者存活组更显著，差异均有统计学意义（见表 2）。同时，进一步分析了脓毒症患者 T 淋巴细胞各亚群构成比的变化，发现与对照组和脓毒症患者存活组比较，脓毒症患者死亡组的外周血$CD3^+CD4^+$细胞比例明显下降（P=0.003，P=0.000），$CD3^+CD8^+$细胞比例增加（P=0.000，P=0.000），$CD4^+/CD8^+$比值下降（P=0.023，P=0.002），差异有统计学意义。见表 3。

表 2 脓毒症患者 T 淋巴细胞亚群绝对值计数的变化(个/μl)

Tab.2 Changes in absolute counts of peripheral blood T lymphocyte subsets in sepsis patients(个/μl)

组别	$CD3^+$	$CD3^+CD4^+$	$CD3^+CD8^+$
对照组	1534.5(1255.0,1756.7)	766.5(629.3,923.5)	600.5(400.2,717.0)
存活组	374.0(274.5,514.0)[a]	198.0(148.5,299.0)[a]	142.0(89.0,184.0)[a]
死亡组	154.0(87.5,256.2)[ab]	68.0(37.7,108.5)[ab]	76.0(48.7,134.5)[a]
χ^2 值	63.520	65.012	49.640
P 值	0.000	0.000	0.000

a:脓毒症患者存活组、死亡组 vs.对照组;b:死亡组 vs.存活组

表 3 脓毒症患者 T 淋巴细胞亚群构成比的变化

Tab.3 Changes in constituent ratios of T lymphocyte subsets in sepsis patients

组别	$CD3^+CD4^+$(%)	$CD3^+CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$
对照组	53.46 ± 9.28	39.33 ± 7.26	1.44 ± 0.51
存活组	55.42 ± 10.68	39.66 ± 11.78	1.64 ± 0.96
死亡组	42.40 ± 5.71[ab]	54.40 ± 4.76[ab]	0.79 ± 0.17[ab]
F 值	7.291	10.205	5.044
P 值	0.001	0.000	0.009

a:脓毒症患者存活组、死亡组 vs. 对照组;b:死亡组 vs. 存活组

2.2 脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞亚群与病情严重程度的关系

进一步分析了脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞亚群与其病情严重程度的相关性，结果发现，脓毒症患者 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$比值均与患者 APACHE Ⅱ评分(图 1，P=0.000)、死亡风险系数(R)均呈负相关系(图 2，P=0.000)。

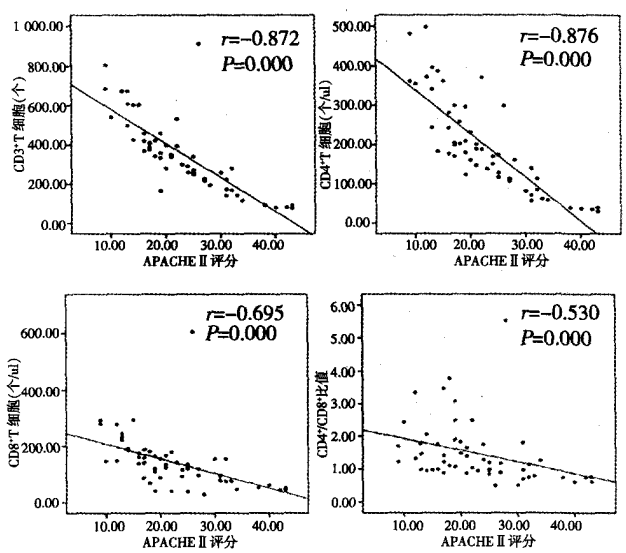


图 1 脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 APACHE Ⅱ评分的相关分析

Fig.1 Correlation between changes of peripheral blood T lymphocyte subsets and APACHE Ⅱ score in sepsis patients

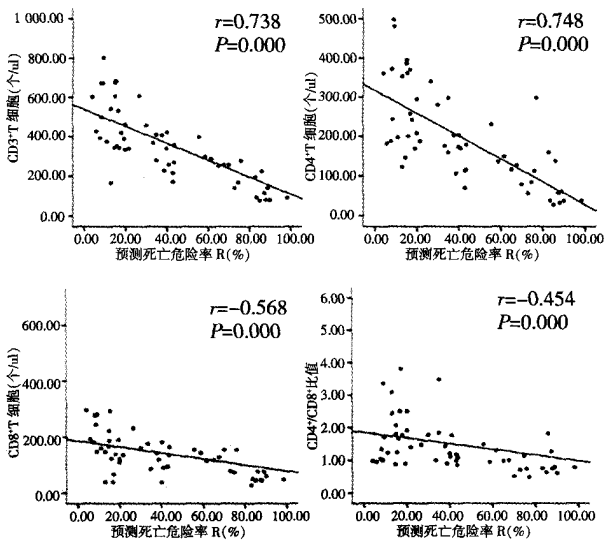
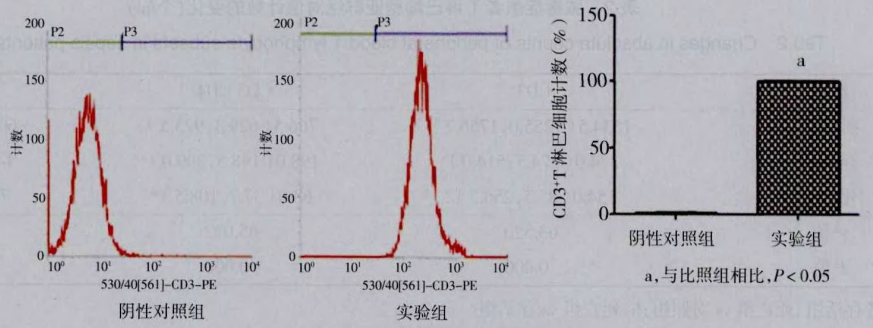


图 2 脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞亚群和预测死亡风险(R)的相关分析

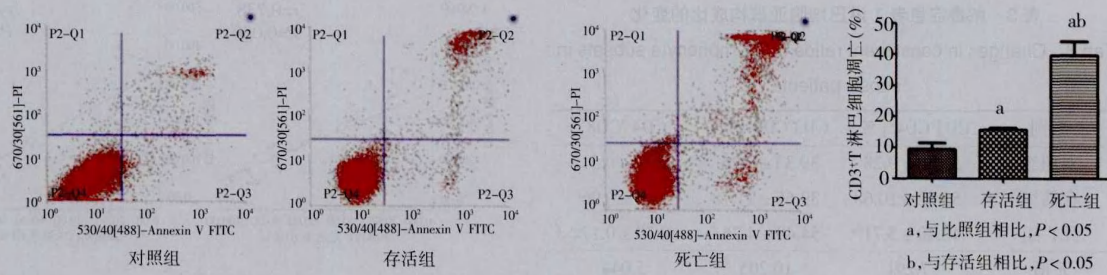
Fig.2 Correlation between changes of peripheral blood T lymphocyte subsets and predicted risk of death score (R)

2.3 脓毒症患者 T 淋巴细胞凋亡的变化

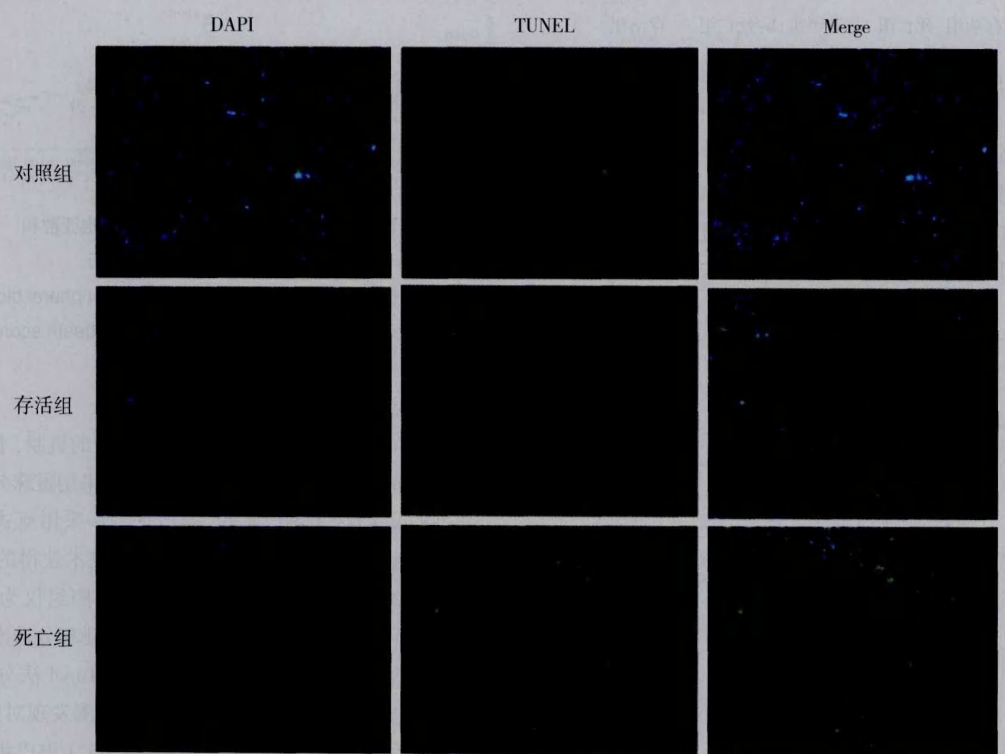
为了探讨脓毒症患者 T 淋巴细胞减少的机制，本课题组进一步研究患者 T 淋巴细胞凋亡的变化。采用磁珠分选技术分离并收集 $CD3^+$T 淋巴细胞，然后进一步采用流式细胞术进行细胞鉴定，结果发现采用磁珠分选技术获得的 $CD3^+$T 淋巴细胞纯度为(99.93 ± 0.06)%，阴性对照组仅为(0.85 ± 0.51)%(t=-337.382，P=0.000)(图 3A)。用磁珠分选出 $CD3^+$T 淋巴细胞后，通过流式细胞技术检测和 Tunel 法分别检测 $CD3^+$T 淋巴细胞的凋亡，流式细胞技术检测发现对照组，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡率分别为(9.53 ± 1.91)%、(15.59 ± 0.54)%、(39.57 ± 4.49)%，3 组间凋亡率差异具有统计学意义(F=94.153，P=0.000)。脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡明显高于对照组(P=0.040，P=0.000)，并且脓毒症患者死亡组 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡明显高于脓毒症患者存活组(P=0.000)(图 3B)。Tunel 染色提示脓毒症患者 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡明显增加，以脓毒症患者死亡组增加更明显(图 3C)。



A. CD3+T 淋巴细胞鉴定和纯度检测



B. 流式检测对照组、脓毒症患者存活组、死亡组 CD3+T 淋巴细胞凋亡



C. Tunel 染色观察 CD3+T 淋巴细胞凋亡

a：脓毒症患者存活组、死亡组 vs. 对照组；b：死亡组 vs. 存活组；$n=3$，$\bar{x} \pm s$

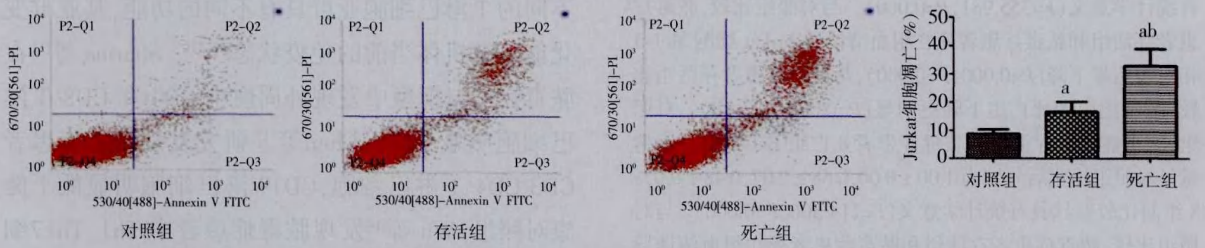
图 3　脓毒症患者 CD3+T 淋巴细胞凋亡增加

Fig.3　Increased CD3+ T lymphocyte apoptosis in peripheral blood from sepsis patients

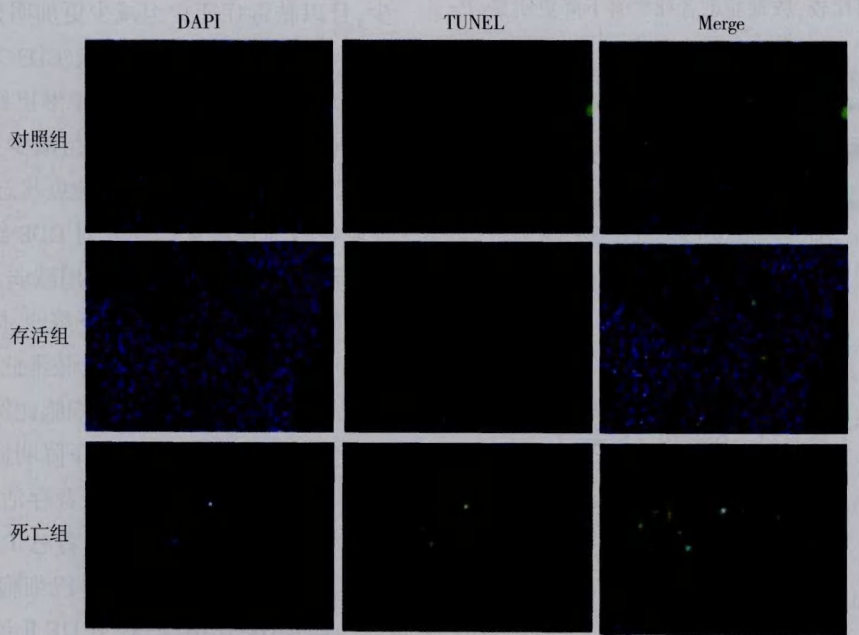
2.4　脓毒症患者血清诱导 T 淋巴细胞凋亡的变化

为了进一步验证脓毒症患者 T 淋巴细胞凋亡情况，用脓毒症患者外周血清和对照组血清刺激体外培养的 Jurkat 淋巴细胞，观察淋巴细胞凋亡的变化。流式细胞技术检测发现，对照组、脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清刺激 Jurkat 淋巴细胞凋亡率分别为(8.56 ± 0.89)%、(16.60 ± 3.55)%、

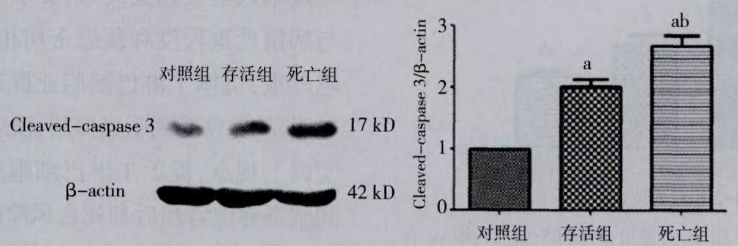
(32.93 ± 5.89)%，3 组间凋亡率差异有统计学意义（F=28.779，P=0.001）。与对照组比较，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清诱导的 Jurkat 淋巴细胞凋亡均明显增加（P=0.049、P=0.000），尤其以脓毒症患者死亡组血清诱导的凋亡增加更为明显（P=0.002）（图 4A）。同时采用 Tunel 染色法进一步验证，结果也有类似的发现（图 4B）。Western blot 法检测对照组，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清刺激 Jurkat 淋巴细胞 Cleaved-caspase3 的表达，与对照组比较，发现脓毒症两亚组患者血清诱导 Jurkat 细胞 Cleaved-caspase3 蛋白水平表达上调，脓毒症患者死亡组上调更明显。对照组，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组 Cleaved-caspase3 相对表达量经对照组标化后分别为 1.00 ± 0.00、2.01 ± 0.21、2.68 ± 0.28，3 组间比较差异有统计学意义（F=52.825，P=0.000）。与对照组比较，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清诱导 Jurkat 细胞 Cleaved-caspase3 相对表达量增加（P=0.001、P=0.000），与存活组比较，脓毒症患者死亡组增加更明显（P=0.007）（图 4C）。



A. 流式细胞术检测用对照组、脓毒症患者存活组血清（存活组）、死亡组血清（死亡组）诱导 Jurkat 细胞凋亡



B. Tunel 染色观察 Jurkat 细胞凋亡



C. Western blot 法检测 Cleaved-caspase 3 的表达

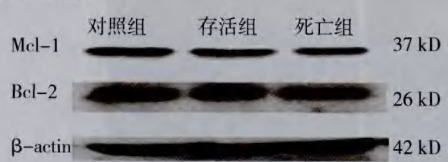
a：脓毒症患者存活组、死亡组 vs. 对照组，P < 0.05，b：死亡组 vs. 存活组，P < 0.05；n=3，$\bar{x} \pm s$

图 4　脓毒症患者血清诱导 T 淋巴细胞凋亡增加

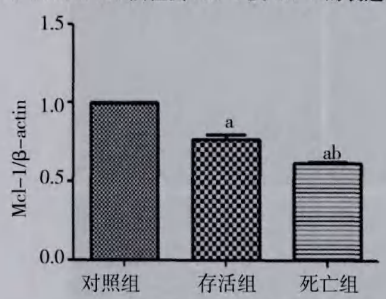
Fig.4　Increased T lymphocyte apoptosis induced by serum from sepsis patients

2.5 脓毒症患者血清诱导 Jurkat 细胞抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 的表达变化

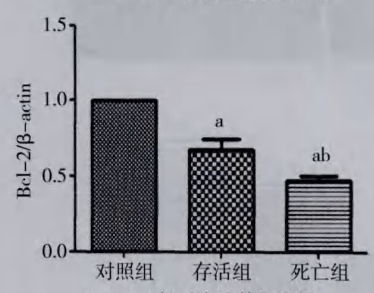
为了研究脓毒症患者血清刺激 Jurkat 淋巴细胞引起凋亡的机制，本研究用不同亚组的脓毒症患者和对照组血清分别诱导 Jurkat 细胞 24 h，Western blot 法结果显示，与对照组比较，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清诱导的 Jurkat 淋巴细胞抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 表达下调，脓毒症患者死亡组下降更明显（图 5A）。对照组，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组 Mcl-1 相对表达量经对照组标化后分别为 1.00 ± 0.00、0.77 ± 0.03、0.61 ± 0.01，3 组间比较差异具有统计学意义（F=355.981，P=0.000）。与对照组比较，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清诱导 Jurkat 细胞 Mcl-1 相对表达量下降（P=0.000、P=0.000），与脓毒症患者存活组比较，脓毒症患者死亡组下降更明显（P=0.000）（图 5B）。对照组，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组 Bcl-2 相对表达量经对照组标化后分别为 1.00 ± 0.00，0.68 ± 0.07，0.48 ± 0.03，3 组间比较差异具有统计学意义（F=114.506，P=0.000）。与对照组比较，脓毒症患者存活组和脓毒症患者死亡组血清诱导 Jurkat 细胞 Bcl-2 相对表达量下降（P=0.000、P=0.000），与脓毒症患者存活组比较，脓毒症患者死亡组下降更明显（P=0.001）（图 5C）。



A. Western blot 法检测 Mcl-1 及 Bcl-2 的表达



B. Mcl-1 相对表达量分析



C. Bcl-2 相对表达数量分析

a：脓毒症患者存活组、死亡组 vs. 对照组，P < 0.05；b：死亡组 vs. 存活组，P < 0.05，n=3，$\bar{x} \pm s$

图 5 脓毒症患者血清诱导 T 淋巴细胞减少抗凋亡蛋白（Mcl-1、Bcl-2）的表达

Fig.5 Down-regulation of Mcl-1 and Bcl-2 expression in T lymphocyte induced by serum from sepsis patients

3 讨 论

外周成熟的 T 淋巴细胞（$CD3^+$）分为 $CD4^+$的辅助性 T 淋巴细胞和 $CD8^+$的抑制性 T 淋巴细胞，前者具有协助体液免疫和细胞免疫的功能，其表面标志为 $CD3^+CD4^+$；后者具有杀伤和抑制功能，在诱导和维持免疫耐受中起作用，其表面标志为 $CD3^+CD8^+$。不同的 T 淋巴细胞亚群具有不同的功能，其亚群变化能反映机体当前的免疫状态[10-11]。Sharma 等[12]在脓毒症小鼠模型中发现外周血中 $CD4^+$和 $CD8^+$T 淋巴细胞明显下降。Chen 等[13]研究发现脓毒症患者 $CD3^+CD4^+$T 淋巴细胞，$CD19^+$淋巴细胞明显低于健康对照组。Wu 等[14]发现脓毒症患者中 Th1、Th17细胞，$CD4^+$、$CD8^+$淋巴细胞以及调节性 T 淋巴细胞减少，且以脓毒症死亡组减少更加明显。本研究也发现脓毒症患者总 T 淋巴细胞（$CD3^+$）、辅助性 T 淋巴细胞（$CD3^+CD4^+$）及抑制性 T 淋巴细胞（$CD3^+CD8^+$）绝对值计数明显下降，死亡组减少更加明显。$CD4^+$/$CD8^+$的比值能预估机体的免疫状态，$CD4^+$细胞反应性降低或无反应状态使其对 $CD8^+$细胞辅助能力下降，导致细胞杀伤和溶解作用减弱，引起 $CD8^+$细胞相对增加，$CD4^+$/$CD8^+$比值下降[15]，提示免疫应答的负调节占优势。本研究发现，脓毒症患者死亡组中 T 淋巴细胞比例失衡，辅助 T 细胞比例下降，抑制T 细胞比例增加，$CD4^+$/$CD8^+$比值下降明显，提示机体存在免疫抑制状态，而脓毒症患者存活组变化不明显。进一步分析发现，脓毒症患者总 T 淋巴细胞、辅助性 T 淋巴细胞和抑制性 T 淋巴细胞绝对值计数，以及 $CD4^+$/$CD8^+$比值与 APACHE Ⅱ评分和预测死亡风险系数呈负相关关系，提示 T 淋巴细胞亚群变化与病情严重程度和预后密切相关，脓毒症患者病情越严重，机体 T 淋巴细胞亚群计数下降及比例失衡越明显，免疫受到明显抑制，预后越差。大量研究也证实以上观点，提示 T 淋巴细胞亚群的变化可作为预测脓毒症患者预后和死亡风险的一个重要指标[16-18]。

细胞凋亡是正常机体细胞遭受生理和病理性刺激后出现的程序性细胞死亡，它和细胞增殖共同维持体内细胞数量动态平衡，在维持免疫稳态及自身耐受中起重要作用，在参与胸腺细胞的选择、生发

中心的发育、杀伤细胞对靶细胞的杀伤，以及免疫应答结束后效应细胞的清除等方面具有重要作用。在脓毒症动物模型中已证实，免疫细胞如巨噬细胞，树突状细胞和 T 淋巴细胞凋亡可扰乱机体的免疫稳态[19]。为了探讨脓毒症患者 T 淋巴细胞计数减少原因，本研究直接采用磁珠分选方法分离脓毒症患者外周血 $CD3^+$ T 淋巴细胞，检测其细胞凋亡情况，结果发现，脓毒症患者外周血 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡明显高于对照组，并且脓毒症患者死亡组 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡明显高于脓毒症患者存活组。同时体外实验用脓毒症患者血清诱导人 Jurkat T 淋巴细胞，发现脓毒症患者血清诱导的 Jurkat 细胞凋亡明显增加，最主要的活化的终末剪切酶 Cleaved-caspase 3 表达明显增加，且与患者病情严重程度相关，脓毒症患者死亡组血清诱导的 Jurkat 细胞凋亡及Cleaved-caspase 3 表达明显高于脓毒症患者存活组，进一步证实脓毒症环境下 T 淋巴细胞凋亡明显增加，且患者病情越重，凋亡越明显，这可能是导致脓毒症患者外周血 T 淋巴细胞计数减少而发生免疫抑制的重要机制。脓毒症作为严重感染导致死亡的主要疾病，其病理生理机制复杂，涉及细胞/代谢异常，出现持续炎症、免疫抑制、分解代谢综合征(persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome, PICS)[1,20]。在脓毒症初始阶段 TNF-α、IL-6 等大量促炎介质的分泌使机体呈现 SIRS，同时产生 IL-10、TGF-β 等抗炎细胞因子使机体呈现 CARS，两者呈一动态变化。Liang 等[21]发现脓毒症患者血清可诱导血管内皮细胞凋亡增加，血清中 vWF、TNF-α 水平明显升高。大量研究也证实脓毒症患者血清的高炎症水平，可导致免疫细胞(DC 细胞、NK 细胞、T 淋巴细胞等)的数目和功能发生变化，使其固有免疫反应和适应性免疫反应均受损，打破免疫稳态造成免疫抑制，甚至免疫麻痹状态[22]。本实验中发现脓毒症患者 $CD3^+$T 淋巴细胞凋亡增加，并且脓毒症患者血清诱导 Jurkat 细胞凋亡也增加，推测脓毒症患者血清中这种高炎性反应状态可导致 T 淋巴细胞凋亡增加，T 淋巴细胞计数减少，细胞亚群比例发生变化，最终扰乱免疫稳态，引起免疫抑制或免疫麻痹。另有研究显示抑制 T 淋巴细胞凋亡可减轻脓毒症诱导的免疫抑制反应和病情严重程度[23-24]，也进一步证实上述观点。而且，本课题组也发现，与脓毒症患者存活组比较，脓毒症患者死亡组 T 淋巴细胞凋亡水平明显升高，也间接提示脓毒症患者免疫抑制越明显，其病情可能越严重，预后越差，出现感染的风险明显增加，甚至引起死亡。同样，有研究也证实脓毒症多数病人死于免疫抑制阶段[25-26]。由于脓毒症患者血清成分复杂，含有各种炎性/抗炎介质，具体哪些因子参与诱导 T 淋巴细胞凋亡尚需进一步研究。

线粒体凋亡途径是细胞凋亡的主要途径之一，Bcl-2 家族主要参与调控线粒体凋亡途径。研究脓毒症患者 T 淋巴细胞内 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2 的表达变化，结果发现脓毒症患者血清诱导的 Jurkat 细胞 Mcl-1、Bcl-2 表达明显减少，病情越严重，Mcl-1、Bcl-2 减少越明显，提示脓毒症患者通过减少抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 表达增加 T 淋巴细胞凋亡。

综上，本研究在体内外实验中探索了脓毒症患者 T 淋巴细胞凋亡的机制及其亚群的变化，分析 T 淋巴细胞凋亡与患者病情严重程度的关系。结果表明脓毒症患者 T 淋巴细胞凋亡增加，绝对值计数减少，免疫抑制可能是加重脓毒症患者的病情和预后的重要机制。

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.

[2] Coopersmith CM, Wunsch H, Fink MP, et al. A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States[J]. Crit Care Med, 2012, 40(4): 1072-1079.

[3] Aziz M, Jacob A, Yang WL, et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis[J]. Leukoc Biol, 2013, 93(3): 329-342.

[4] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(8): 486-499.

[5] Citro A, Barnaba V, Martini H. From T cell apoptosis to chronic immune activation in inflammatory diseases[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 164(2): 140-146.

[6] Binkowska AM, Michalak G, Słotwiński R. Current views on the

mechanisms of immune responses to trauma and infection[J]. Cent Eur J Immunol,2015,40(2):206-216.

[7] Hutchins NA,Unsinger J,Hotchkiss RS,et al. The new normal:immunomodulatory agents against sepsis immune suppression[J]. Trends Mol Med ,2014,20(4):224-233.

[8] Monneret G,Venet F,Pachot A,et al. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient:a new skin for the old ceremony[J]. Mol Med,2008,14(1-2):64-78.

[9] Dellinger RP,Levy MM,Rhodes A,et al. Surviving Sepsis Campaign:international guidelines for management of severe sepsis andseptic shock[J]. Intensive Care Med,2013,39(2):165-228.

[10] Ivanova EA,Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer:An Overview[J]. Biomed Res Int,2015(2015):327470.

[11] Gerritsen B,Pandit A. The memory of a killer T cell:Models of $CD8^+$ T cell differentiation[J]. Immunol Cell Biol,2016,94(3):236-241.

[12] Sharma A,Yang WL,Matsuo S,et al. Differential alterations of tissue T-cell subsets after sepsis[J]. Immunol Lett,2015,168(1):41-50.

[13] Chen X,Ye J,Ye J. Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets and prognosis in patients with septic shock[J]. Microbiol Immunol,2011,55(10):736-742.

[14] Wu HP,Chung K,Lin CY,et al. Associations of T helper 1,2,17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis[J]. Inflamm Res ,2013,62(8):751-763.

[15] Yang X,Hu B,Sun R,et al. Deregulation of T cell response in sepsis[J]. Front Biosci(Landmark Ed),2014(19):1370-1376.

[16] Conlledo R,Rodríguez Á,Godoy J,et al. Total globulins and lymphocyte count as markers of mortality in sepsis and septic shock[J]. Rev Chilena Infectol,2012,29(2):192-199.

[17] Liu H,Liu G,Tian Z. Changes in blood lymphocytes in sepsis patients[J].Chin Crit Care Med ,2014,26(3):148-152.

[18] Drewry AM,Fuller BM,Skrupky LP,et al. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistentlymphopenia[J]. Crit Care Med ,2015,43(6):1165-1169.

[19] Luan YY,Dong N,Xie M,et al. The significance and regulatory mechanisms of innate immune cells in the development of sepsis[J]. J Interferon Cytokine Res,2014,34(1):2-15.

[20] Gentile LF,Cuenca AG,Efron PA,et al.Persistent inflammation and immunosuppression:a common syndrome and new horizon for surgical intensive care[J]. J Trauma Acute Care Surg,2012,72(6):1491-1501.

[21] Liang Y,Li X,Zhang X,et al. Elevated levels of plasma TNF-α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-κB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells[J]. Shock,2014,41(4):275-281.

[22] Rimmelé T,Payen D,Cantaluppi V,et al. Immune cell phenotype and function in sepsis[J].Shock,2016,45(3):282-291.

[23] Luan YY,Yao YM,Xiao XZ,et al. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis[J]. J Interferon Cytokine Res,2015,35(1):17-22.

[24] Kim JS,Kim SJ,Lee SM. Genipin attenuates sepsis-induced immunosuppression through inhibition of T lymphocyteapoptosis[J]. Int Immunopharmacol,2015,27(1):15-23.

[25] Delano MJ,Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction:can immune therapies reduce mortality[J]. J Clin Invest,2016,126(1):23-31.

[26] Hotchkiss RS,Monneret G,PayenD. Immunosuppression in sepsis:a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach[J]. Lancet Infect Dis,2013,13(3):260-268.

（责任编辑：冉明会）