

脓毒症导致小鼠胸腺萎缩的原因探讨

张卫梅 孔雅娴 栗雅杰 孟庆才 曾辉

【摘要】 目的 利用小鼠盲肠结扎穿刺模型探讨脓毒症导致胸腺萎缩的原因。方法 采用盲肠结扎穿刺(CLP)手术建立脓毒症小鼠模型(脓毒症组),以假手术(Sham)小鼠作为对照组。术后7 d,采用流式细胞仪检测小鼠胸腺中各群胸腺细胞和胸腺前体细胞比例的变化及胸腺细胞凋亡情况。结果 与对照组相比,脓毒症组小鼠的胸腺明显萎缩,胸腺细胞的绝对计数显著减少($P < 0.001$);胸腺中的 $CD4^-CD8^-$ 细胞(DN)、 $CD4^+CD8^+$ 细胞(DP)、 $CD4^+CD8^-$ 细胞、 $CD8^+CD4^-$ 细胞数亦明显减少($P < 0.001$);胸腺中 $Lin^-CD44^+CD117^+$ 前体细胞比例显著降低($P < 0.001$);各群胸腺细胞凋亡的比例均显著增加($P < 0.001$)。结论 脓毒症模型小鼠胸腺萎缩不仅与胸腺细胞凋亡增加有关,与胸腺前体细胞减少也相关。

【关键词】 脓毒症;胸腺萎缩;淋巴细胞;细胞凋亡;胸腺前体细胞

Research on mechanisms of thymus atrophy induced by sepsis ZHANG Wei-mei, KONG Ya-xian, LI Ya-jie, MENG Qing-cai, ZENG Hui. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms of thymus atrophy induced by sepsis with mouse model which received caecal ligation and puncture (CLP). **Methods** The model of sepsis was made by CLP and sham operation was taken as the control group. The changes of different stages of T lymphocyte and T lymphocyte progenitors in thymus were analyzed with flow cytometer 7 days after CLP. The apoptosis of T lymphocytes was analyzed with Annexin-V staining. **Results** Compared with the control group, the thymus of sepsis mice atrophied obviously, accompanied by a significant decrease of thymocyte counts in different stages including $CD4^-CD8^-$ (double-negative, DN), $CD4^+CD8^+$ (double-positive, DP), $CD4^+CD8^-$ and $CD8^+CD4^-$ thymocytes ($P < 0.001$). Meanwhile, sepsis mice showed an increased percentage of Annexin⁺ thymocytes ($P < 0.001$). Moreover, decreased frequency of T lymphocyte progenitor cells ($Lin^-CD44^+CD117^+$) was observed in the thymus of sepsis mice ($P < 0.001$). **Conclusions** Sepsis-induced thymus atrophy was not only related to the increased proportion of apoptosis of thymocytes, but also to the decrease of T lymphocyte progenitors.

【Key words】 Sepsis; Thymus atrophy; Lymphocytes; Apoptosis, T lymphocyte progenitors

脓毒症(sepsis)是严重创伤、烧伤、感染等患者的严重并发症之一,可诱发休克、多器官功能障碍综合征^[1-3]。天然免疫系统的过度激活在脓毒症的发生、发展过程中发挥了重要作用,在临床中受到高度重视。近期研究表明,脓毒症也可导致适应性免疫系统功能失衡^[3]。胸腺是免疫系统中重要的中枢器官,是T淋巴细胞分化和成熟的主要场所,对多种刺激反应非常敏感。有研究证实,低剂量持续腹腔注射内毒素或行盲肠结扎穿刺(caecal ligation and

puncture, CLP)均可诱导啮齿类动物胸腺萎缩^[4]。本研究应用脓毒症动物模型,探讨脓毒症导致小鼠胸腺萎缩的机制。

材料和方法

一、实验动物

本研究采用SPF级C57BL/6雄性小鼠,鼠龄6~8周,体重18~23g,购自中国医学科学院动物研究所。

二、主要试剂和材料

抗-CD4-APC、抗-CD44-FITC、抗-CD19-Biotin、抗-CD8-Biotin、抗-TCR-Biotin、抗-TCR-Biotin、抗-NK1.1-Biotin、抗-CD49-Biotin和抗-CD127-Biotin均购自美国eBioscience公司;抗-CD8-PE、抗-CD117-APC

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.003

基金项目:国家自然科学基金(81101251)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

通讯作者:曾辉,Email:zenghui@ccmu.edu.cn

和抗-Biotin Mouse Lineage Panel 均购自美国 BD 公司; Annexin V-FITC 购自 Biolegend 公司。

三、实验方法

1. 脓毒症动物模型的建立: 参照 Wichterman 等^[5] 操作规程, 采用盲肠结扎穿刺 (caecal ligation and puncture, CLP) 手术制作脓毒症小鼠模型。小鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 作 1~2 cm 长的腹正中切口; 游离出盲肠, 并在盲肠近端约 15 mm 的位置用 5/0 号丝线结扎, 以 18 号针头于盲肠穿刺 1 处, 并挤出少量肠内容物以保持穿刺孔开放。还纳肠管, 丝线缝合关腹。术后于皮下注射 1 ml 生理盐水。对照组小鼠只进行开腹和分离盲肠。

2. 小鼠胸腺细胞的分离: 术后 7 d 处死动物, 迅速分离完整的胸腺, 制备单细胞悬液, 显微镜下计数。

3. 流式细胞检测: 按文献操作方法进行胸腺细胞各发育阶段染色^[6]。其中 Mouse Lineage Panel 包括抗-CD19、抗-CD8、抗-TCR、抗-TCR、抗-NK1.1、抗-CD49、抗-CD127。在细胞表面标注染色后, 采用 Annexin V 试剂盒按说明书进行染色。采用 FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行检测。

四、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、脓毒症对小鼠胸腺和胸腺细胞数的影响

与对照组相比, 脓毒症组小鼠的胸腺明显萎缩 (图 1)。显微镜下计数胸腺细胞, 分别为对照组 $(16.973 \pm 1.859) \times 10^7$ 和脓毒症组 $(0.833 \pm 0.274) \times 10^7$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

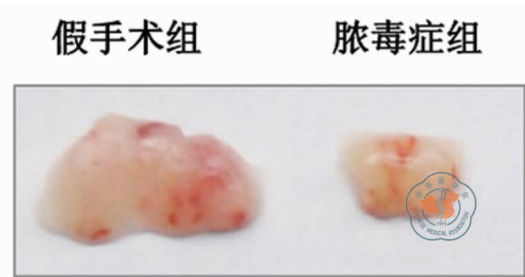


图 1 与假手术组相比, 脓毒症胸腺明显萎缩

二、脓毒症对小鼠胸腺中各群胸腺细胞数量和胸腺细胞凋亡情况的影响

与对照组相比, 脓毒症组小鼠胸腺中 $CD4^- CD8^-$ 细胞 (double-negative, DN)、 $CD4^- CD8^+$ 细胞 (double-positive, DP)、 $CD4^+ CD8^-$ 细胞和 $CD8^+ CD4^-$ 细胞的数量显著降低 ($P < 0.001$) (表 1), 而 DN、DP、 $CD4^+ CD8^-$ 、 $CD8^+ CD4^-$ 细胞凋亡的比例显著增加 ($P < 0.001$) (图 2B、表 2)。

表 1 胸腺中各群胸腺细胞的数量 ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)

组别	例数	$CD4^- CD8^-$	$CD4^- CD8^+$	$CD4^+ CD8^-$	$CD8^+ CD4^-$
对照组	7	0.56 ± 0.05	14.55 ± 1.89	2.05 ± 0.18	0.69 ± 0.07
脓毒症组	11	0.08 ± 0.02^a	0.54 ± 0.25^a	0.08 ± 0.02^a	0.13 ± 0.03^a

注: 脓毒症组与对照组相比, $^a P < 0.001$

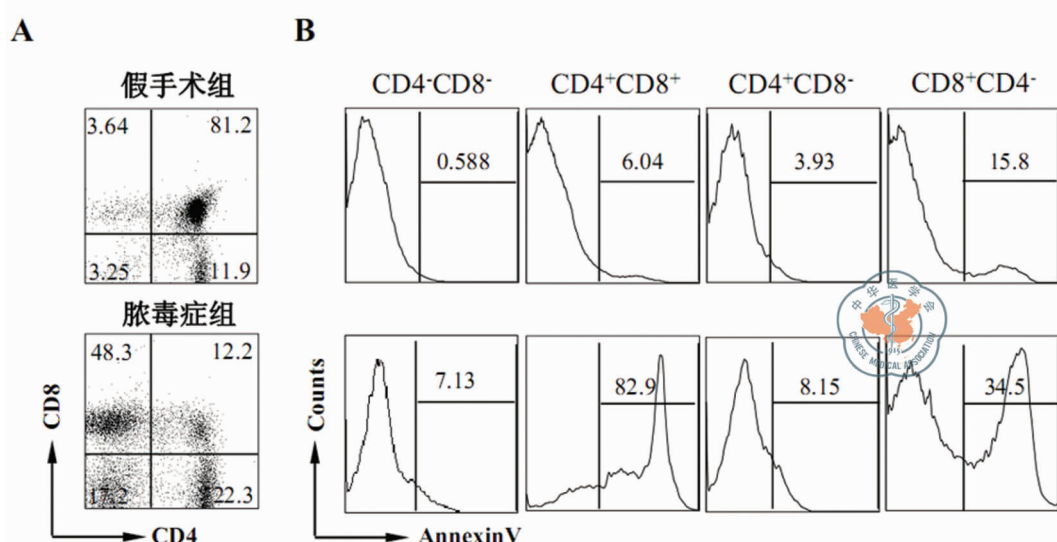


图 2 A: 两组小鼠胸腺细胞 CD4、CD8 流式分析; B: 两组小鼠胸腺细胞凋亡 (Annexin-V) 的流式分析

表2 各群胸腺细胞凋亡比例变化($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)

组别	例数	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD8 ⁺ CD4 ⁻
对照组	7	0.69 ± 0.1	5.72 ± 0.24	3.22 ± 0.16	17.43 ± 1.80
脓毒症组	11	10.06 ± 2.06 ^a	42.02 ± 9.54 ^a	20.47 ± 5.95 ^a	43.22 ± 4.71 ^a

注:脓毒症组与对照组相比,^a $P < 0.001$

三、脓毒症对小鼠胸腺前体细胞的影响

与对照组小鼠相比,脓毒症小鼠胸腺前体细胞的比例显著降低,从对照组的(0.030 ± 0.003)%下降到脓毒症组的(0.007 ± 0.002)%,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.001$)(图3)。

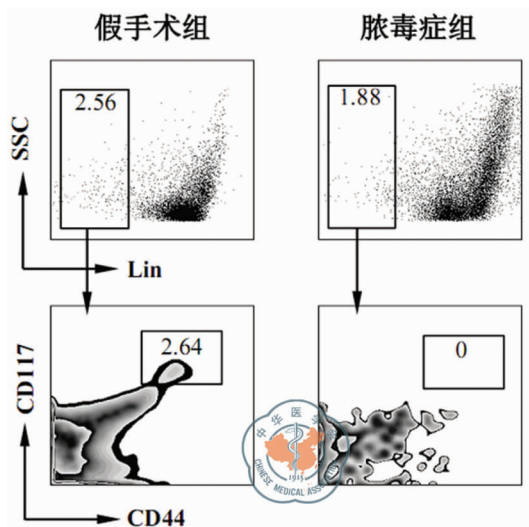


图3 两组小鼠胸腺前体细胞的流式分析

讨 论

生理条件下,哺乳动物随着年龄的增长胸腺会发生慢性萎缩;急性胸腺萎缩则主要发生在病理条件下,多见于感染性疾病,如病毒、细菌以及霉菌感染等^[7]。与年龄依赖的慢性胸腺萎缩不同,急性病理条件所导致的胸腺萎缩发生较为迅速,疾病消除时可自行恢复^[8]。Wang等^[4]早在1994年已报道了脓毒症所导致胸腺萎缩是由DP细胞数骤降而引起。后续研究证实,脓毒症导致淋巴细胞大量凋亡是胸腺萎缩的主要原因。脓毒症死亡患者外周血凋亡的淋巴细胞明显增加,淋巴细胞中Bcl-2表达显著下降^[9]。采用体内注射Caveolin-1蛋白、PDL1阻断抗体以及CD40竞争性抗体等方式均能通过抑制胸腺细胞凋亡进而改善脓毒症小鼠的预后^[10-12]。

与既往研究相同,本研究中发现CLP术后小鼠胸腺萎缩,胸腺细胞数急剧减少。另外,DP、DN、CD4⁺CD8⁻和CD8⁺CD4⁻细胞数均明显降低,尤以DP细胞数下降更为显著。同时,Annexin V染色表

明,脓毒症组胸腺中的各群细胞的凋亡均显著增加,提示脓毒症小鼠胸腺中淋巴细胞凋亡不仅局限于DP细胞,而且影响由DN细胞到SP细胞(single-positive cell)的整个发育过程。更为重要的是,本研究发现脓毒症小鼠胸腺中的Lin⁻CD44⁺CD117⁺胸腺前体细胞明显减少,提示感染可在更早期阶段影响T淋巴细胞生成。

研究表明,尽管脊椎动物的造血可以在很多器官发生,但胸腺是T淋巴细胞分化的唯一场所^[13-16]。生理条件下,造血干祖细胞首先迁移到外周血中,继而到达胸腺成为T淋巴前体细胞最终发育为T细胞^[17]。感染所导致Lin⁻CD44⁺CD117⁺细胞减少的机制目前尚不清楚,推测可能有以下几种机制参与:(1)脓毒症引起骨髓造血干细胞减少或分化方向改变进而导致迁移到胸腺的胸腺前体细胞减少;(2)脓毒症导致胸腺前体细胞自身凋亡增多;(3)脓毒症引起胸腺微环境发生改变而导致胸腺前体细胞向外周迁移增多。其更确切的机制仍有待于进一步的研究和证实。

参 考 文 献

- 1 姚咏明,盛志勇,林洪远,等. 脓毒症定义及诊断的新认识. 中国危重病急救医学,2004,16(6):321-324.
- 2 李军,周红. 脓毒症发病机制及其防治措施的研究进展. 重庆医学,2006,35(16):1503-1505.
- 3 郭小文,朱美飞,徐勇刚,等. 针刺足三里、关元穴对脓毒症大鼠胸腺细胞凋亡的影响. 中国中医急症,2010,19(3):475-477.
- 4 Wang SD, Huang KJ, Lin YS, et al. Sepsis induced apoptosis of the thymocytes in mice. J Immunol,1994,152(10):5014-5021.
- 5 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res,1980,29(2):189-201.
- 6 Billard MJ, Gruver AL, Sempowski GD. Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. PLoS One,2011,6(3):1-14.
- 7 Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. PLoS Pathog,2006,2(6):472-483.
- 8 Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. Curr Top Pathol,1986,75:43-88.
- 9 Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. Am J Respir Crit Care Med,2001,164(3):389-395.

- 10 Feng H, Guo L, Li XA, et al. Caveolin-1 protects against sepsis by modulating inflammatory response, alleviating bacterial burden and suppressing thymocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 2010, 285 (33): 25154-25160.
- 11 Zhang Y, Zhou Y, Cai Z, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care*, 2010, 14 (6) :220-229.
- 12 Schwulst SJ, Grayson MH, DiPasco PJ, et al. Agonistic monoclonal antibody against CD40 receptor decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol*, 2006, 177 (1) :557-565.
- 13 Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000, 248: 67-107.
- 14 Boehm T, Bleul CC. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2007, 8(2) :131-135.
- 15 Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends immunol*, 2004, 25(12) :640-644.
- 16 Ratcliffe MJ. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol*, 2006, 30(1-2) :101-118.
- 17 Sitnicka E. From the bone marrow to the thymus: the road map of early stages of T-cell development. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29(6) : 487-530.

(收稿日期:2011-12-10)

(本文编辑:孙荣华)

张卫梅,孔雅娴,栗雅杰,等. 脓毒症导致小鼠胸腺萎缩的原因探讨[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6 (2) :97-100.

