

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.09.1139

• 论 著 •

脓毒症早期恒定自然杀伤 T 细胞活化对预后的影响

费苗苗,郭 玉,王嘉锋,万小健\*  
第二军医大学长海医院麻醉学部,上海 200433

**【摘要】 目的** 探讨脓毒症早期外周血恒定自然杀伤 T (iNKT)细胞活化对炎症及病情的影响。**方法** 取健康雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,分别为假手术组、盲肠结扎穿孔(CLP)脓毒症模型组和 CLP 模型+CD1d 阻断性抗体预处理组(抗-CD1d 组)。CLP 术后 24 h 应用流式细胞术检测小鼠外周血、脾脏、胸腺 iNKT 细胞水平,ELISA 法后检测血清肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和 IL-4 等细胞因子水平,分析 iNKT 细胞与细胞因子的相关性,检测外周血和腹腔灌洗液中的细菌菌落数。观察各组小鼠 CLP 后 10 d 生存率。选取脓毒症确诊患者及健康志愿者各 20 例,年龄 18~70 岁,检测脓毒症患者及健康志愿者外周血 iNKT 细胞比例及细胞因子水平,分析 iNKT 细胞与细胞因子及急性生理和慢性健康(APACHE II)评分的相关性。**结果** 脓毒症模型组小鼠的 iNKT 细胞和 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平均高于假手术组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),外周血及腹腔中细菌菌落数高于假手术组( $P<0.01$ ),术后 7 d 内小鼠全部死亡;与脓毒症模型组小鼠相比,给予抗-CD1d 抗体预处理后,抗-CD1d 组小鼠外周血、脾脏、胸腺的 iNKT 细胞比例下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平及外周血和腹腔液中细菌菌落数减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),术后第 10 天时小鼠仍存活 4 只。脓毒症患者的 iNKT 细胞及细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平相比健康对照组增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),且 iNKT 细胞与 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平及 APACHE II 评分呈正相关( $P<0.05$ )。**结论** 脓毒症早期外周血 iNKT 细胞水平明显增加并与脓毒症病情严重程度及预后有一定关系,提示 iNKT 细胞可能在脓毒症炎症反应中起重要调节作用。

**【关键词】** 脓毒症;恒定自然杀伤 T 细胞;细胞因子类;预后

**【中图分类号】** R 631 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0258-879X(2017)09-1139-07

Effects of invariant natural killer T cell activation on prognosis in early sepsis

FEI Miao-miao, GUO Yu, WANG Jia-feng, WAN Xiao-jian\*  
Department of Anesthesiology and Intensive Care, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of invariant natural killer T (iNKT) cell activation on inflammation and severity of early sepsis. **Methods** Healthy C57BL/6 male mice were randomly divided into 3 groups: sham group, cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis model group (CLP group) and CLP-induced sepsis model plus treatment with anti-CD1d blocking antibody group (anti-CD1d group). Flow cytometry was used to determine the frequencies of the iNKT cells in the peripheral blood, spleen and thymus of mice after 24 h of CLP operation. Meanwhile, the ELISA assay was used to detect the serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and IL-4. The correlation of iNKT cells and cytokine was analyzed. The bacterial colonies in peripheral blood and peritoneal lavage fluid were determined. The 10-day survival rates of mice after CLP operation were observed. Twenty patients with confirmed sepsis and 20 healthy volunteers aging 18-70 years were selected. The frequency of peripheral blood iNKT cells and serum cytokine levels of all patients and healthy volunteers were detected. Correlations of iNKT cells and cytokines, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) scores in septic patients were analyzed. **Results** Compared with the sham group, the mice in the CLP group showed significantly

【收稿日期】 2017-03-29 【接受日期】 2017-06-29  
【基金项目】 上海市卫生和计划生育委员会基金(20124321)。Supported by Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (20124321).  
【作者简介】 费苗苗,硕士,住院医师。E-mail: feimm1990@126.com  
\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161847, E-mail: xiaojian.wan@yahoo.com

more iNKT cells, significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and significantly higher levels of bacterial colonies in peripheral blood and peritoneal lavage fluid ( $P<0.01$ ). The mice in the CLP group all died within 7 days after operation. In the mice of the anti-CD1d group, iNKT cell proportions in peripheral blood, spleen and thymus, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4 in peripheral blood, and the bacterial burden in the abdominal cavity were decreased compared with the CLP group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Four mice in anti-CD1d group survived at 10 days of post-operation. Compared with healthy volunteers, septic patients displayed significantly higher frequency of iNKT cells and significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Moreover, there was a positive correlation between frequency of iNKT cells with serum IFN- $\gamma$  and IL-4 and the score of APACHE II ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Increase of peripheral blood iNKT cells in early sepsis is associated with the severity and prognoses of sepsis, which suggests iNKT cells may play an important role in the inflammation of sepsis.

[**Key words**] sepsis; invariant natural killer T cell; cytokines; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(9): 1139-1145]

脓毒症是机体对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>。该病发病率高,病情进展迅速,全球每年有超过 1 800 万严重脓毒症病例,病死率高达 30%~70%,且这一数字还在逐年递增<sup>[2]</sup>。一般认为,脓毒症早期机体出现全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),而后出现免疫抑制反应,导致继发感染<sup>[3]</sup>。研究发现,脓毒症炎症反应可诱导淋巴细胞凋亡、辅助性 T(Th)细胞由 Th1 细胞向 Th2 细胞漂移和调节性 T 细胞(T<sub>reg</sub> 细胞)增多等免疫抑制表现,这不但有助于阐明脓毒症的免疫调控机制,也为脓毒症的治疗提供新的靶点<sup>[4]</sup>。

恒定自然杀伤 T(invariant natural killer T, iNKT)细胞是兼具 T 细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞表型和功能的特殊 T 细胞亚群,具有特殊的免疫调节功能和细胞毒作用,是目前的研究热点。近年来研究表明,iNKT 细胞作为免疫应答的重要细胞,在肿瘤、自身免疫性疾病及脓毒症中起到重要作用<sup>[5-7]</sup>。本研究拟通过小鼠盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)脓毒症模型以及临床对照研究探讨脓毒症早期 iNKT 细胞与炎症反应、预后以及病情严重程度之间的相互关系,明确 iNKT 细胞在脓毒症发生、发展中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物实验

1.1.1 动物分组和造模 健康雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄,体质量 20~25 g)由第二军医大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(沪)2012-0003。采用随机数字表法,将小鼠随机分为假手术组、CLP

手术脓毒症组(CLP 组)和抗-CD1d 组。假手术组开腹后不进行 CLP 手术,CLP 组和抗-CD1d 组构建 CLP 脓毒症模型;抗-CD1d 组于术前 3 h 给予抗-CD1d 阻断性抗体,假手术组及 CLP 组给予相应的同型对照进行干预。造模后每天背部注射头孢呋辛钠(意大利 GlaxoSmithKline 公司,批号:J670) 50 mg/kg 抗感染及 1 mL 生理盐水补充容量,自由饮食饮水。

1.1.2 小鼠 iNKT 细胞、细胞因子及细菌负荷检测 假手术组、CLP 组和抗-CD1d 组小鼠各 8 只,于 CLP 24 h 后,采集全部小鼠外周血(心脏采血)及腹腔灌洗液,并取脾脏及胸腺标本。脾脏及胸腺标本加入 1 mL 灭菌 PBS 后碾压均匀,滤网滤出细胞悬液,吹打均匀后置入离心管中备用。用 TCR $\beta$ -FITC、 $\alpha$ -GalCer/CD1d-PE(BD 公司,美国)标记细胞,应用流式细胞仪检测外周血、脾脏和胸腺中 iNKT 细胞水平,TCR $\beta$ 、 $\alpha$ -GalCer/CD1d 标记双阳的细胞为小鼠 iNKT 细胞。分离外周血血清,应用 ELISA 试剂盒(eBioscience 公司,美国)检测外周血细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和 IL-4 水平。小鼠外周血及腹腔灌洗液稀释后均匀涂于铺好的灭菌琼脂糖凝胶上,37 °C 恒温培养 24 h 后进行菌落计数。菌落计数根据稀释浓度最终换算到原液菌落数目,以菌落形成单位(clonal formation unit, CFU)为计量单位。

1.1.3 小鼠生存情况观察 假手术组、CLP 组和抗-CD1d 组小鼠各 10 只,造模后连续观察 10 d,记录小鼠生存情况。

### 1.2 临床研究

1.2.1 受试者筛选 采用病例对照方法进行前瞻

性分析。病例组选取 2016 年 4 月至 2017 年 3 月第二军医大学长海医院 ICU 收治的脓毒症患者 20 例, 年龄 18~70 岁, 原发病主要为急腹腹腔感染及腹腔术后感染, 记录其入 ICU 24 h 内急性生理和慢性健康(APACHE II)评分的最低评分。纳入标准: 根据 Sepsis 3.0 诊断标准及患者临床症状评估脓毒症, 患者血液或体液细菌学培养连续 2 次一致且同时伴有临床感染症状, 序贯器官衰竭估计(SOFA)评分 $\geq 2$  分。排除标准: 慢性心、肝、肺、肾、血液系统疾病史; 恶性肿瘤; 长期服用免疫抑制剂。对照组选取同期 20 名健康成人志愿者, 年龄 18~70 岁, 不限制性别及职业, 来源主要为健康体检者及医院工作人员。本研究获得第二军医大学长海医院伦理委员会批准, 所有入选患者均签署知情同意书。

病例组 20 例患者中, 男 14 例, 女 6 例; 年龄( $51.35 \pm 10.52$ ) 岁; SOFA 评分为  $6.75 \pm 3.77$ , APACHE II 评分  $21.90 \pm 5.79$ ; 细菌培养结果: 大肠埃希菌 13 例, 粪肠球菌 1 例, 阴沟肠杆菌 7 例, 鹌鸡肠球菌 1 例, 尿肠球菌 5 例, 金黄色葡萄球菌 1 例, 洋葱伯克霍尔德菌 1 例, 鲍曼不动杆菌 1 例, 铜绿假单孢菌 2 例, 黄单孢菌 1 例; 其中 2 例检出 3 株细菌, 9 例检出 2 株细菌, 9 例检出 1 株细菌。对照组 20 名健康志愿者中, 男 12 名, 女 8 名, 年龄( $50.32 \pm 11.35$ ) 岁。

1.2.2 受试者 iNKT 细胞和细胞因子检测 取入

组病例清晨空腹静脉血 4 mL,  $300 \times g$  离心 10 min。取血清, 加入无菌 PBS 稀释 1 倍, 采用 ELISA 试剂盒(R&D 公司, 美国)检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平; 沉淀细胞使用红细胞裂解液裂解红细胞, 用 1 mL PBS 洗涤后按照推荐剂量加入荧光标记的单克隆抗体抗人 Vb11-FITC 和抗人 V $\alpha$ 24-PE(BD 公司, 美国), 避光孵育 30 min, 加入 1 mL PBS 洗涤,  $300 \times g$  离心 5 min, 再加入 200  $\mu$ L PBS, 上流式细胞仪(BD 公司, 美国)检测, V $\alpha$ 24 和 Vb11 双阳的细胞为 iNKT 细胞。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 (SPSS Inc, 美国)及 GraphPad Prism 5.0(Graphpad Software, 美国)软件进行数据处理和分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组数据先经 one-way ANOVA 检测, 两组比较采用 *t* 检验, 相关性采用 Pearson 相关性分析, 小鼠生存率采用 log-rank 检测。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

2 结 果

2.1 脓毒症小鼠 iNKT 细胞水平 如图 1 所示, CLP 组小鼠外周血、脾脏、胸腺中的 iNKT 细胞水平相较假手术组增加, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 而给予抗-CD1d 阻断性抗体后, iNKT 细胞活化减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

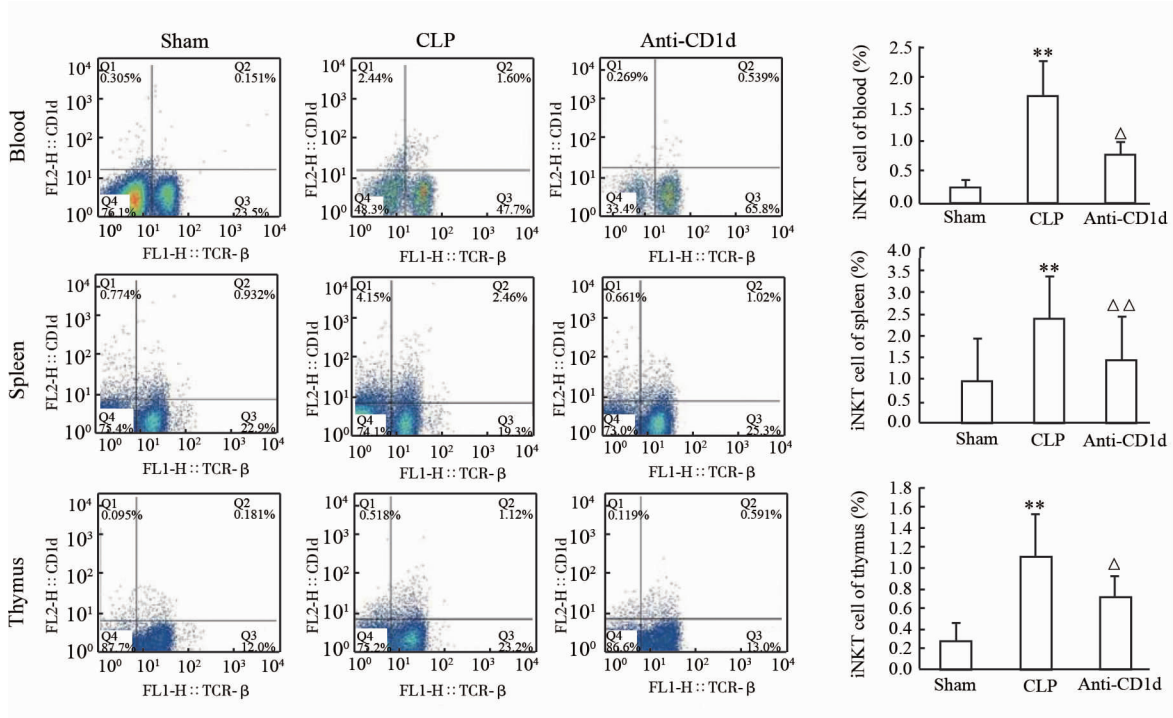


图 1 流式细胞术检测小鼠外周血、脾脏、胸腺 iNKT 细胞水平

Fig 1 iNKT cell frequencies of peripheral blood, spleen and thymus of sepsis mice were detected by flow cytometry

iNKT: Invariant natural killer T; CLP: Cecal ligation and puncture. \*\*  $P < 0.01$  vs sham group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs CLP group.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 脓毒症小鼠 iNKT 细胞水平与细胞因子的相关性 如图 2 所示,CLP 组小鼠外周血细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平相比假手术组均升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );给予抗-CD1d 阻断性抗体预处理后,小鼠细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平较 CLP 组下降 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。相关性分析结果显示,脓毒症小鼠 iNKT 细胞水平与 IFN- $\gamma$  和 IL-4 呈正相关( $r=0.593$ ,  $P=0.046$ ;  $r=0.689$ ,  $P=0.02$ ),而

与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 无明显相关性;给予抗-CD1d 阻断性抗体的脓毒症小鼠外周血 iNKT 细胞与细胞因子间无明显相关性。

2.3 抗-CD1d 抗体对脓毒症小鼠细菌负荷的影响 CLP组小鼠外周血及腹腔灌洗液中细菌菌落数相比假手术组增加 ( $P<0.01$ ),而抗-CD1d 组与 CLP 组相比细菌菌落数减少 ( $P<0.01$ ,图 3)。

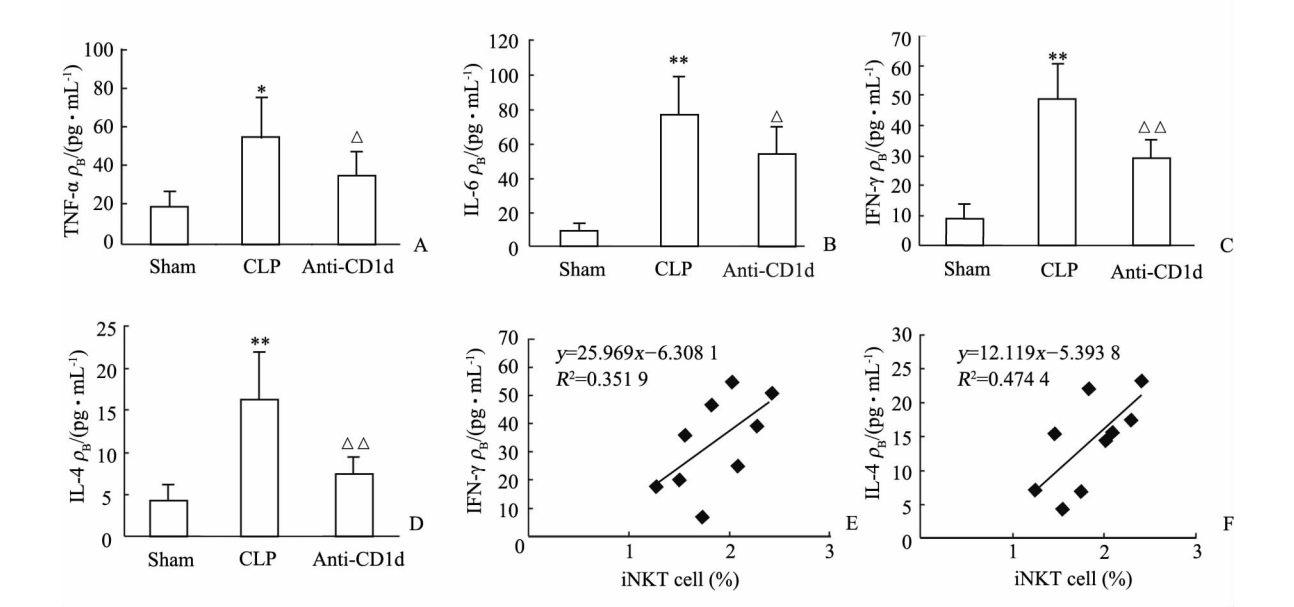


图 2 脓毒症小鼠外周血细胞因子水平及 iNKT 细胞与细胞因子相关性分析

Fig 2 Correlations of peripheral blood iNKT cells and serum cytokine level in sepsis mice

A-D: TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-4 level in peripheral blood, respectively; E, F: Correlation between iNKT cell frequency with IFN- $\gamma$  and IL-4, respectively. iNKT: Invariant natural killer T; CLP: Cecal ligation and puncture; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL: Interleukin; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ . \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs sham group;  $\Delta$   $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P<0.01$  vs CLP group.  $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$

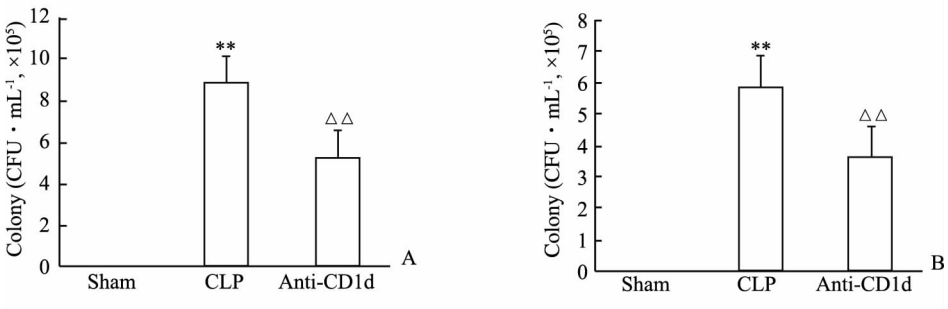


图 3 给予抗-CD1d 抗体后小鼠外周血及腹腔灌洗液中细菌负荷比较

Fig 3 Effects of anti-CD1d antibody on bacterial burden in peripheral blood and peritoneal lavage fluid of sepsis mice

A: Bacterial burden in peripheral blood; B: Bacterial burden in lavage fluid. CLP: Cecal ligation and puncture; CFU: Clonal formation unit. \*\*  $P<0.01$  vs sham group;  $\Delta\Delta$   $P<0.01$  vs CLP group.  $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.4 抗-CD1d 抗体对脓毒症小鼠生存率的影响 CLP组小鼠每天死亡数分别为 2、2、1、1、2、1、1,第 7 天已全部死亡;抗-CD1d 组小鼠每天死亡数分别为 1、1、1、0、0、1、1、0、1、0,第 10 天时剩余 4 只;假

手术组无小鼠死亡。统计分析发现,CLP 组小鼠死亡率高于假手术组,而给予抗-CD1d 阻断性抗体后死亡率下降 ( $P<0.01$ ,图 4)。



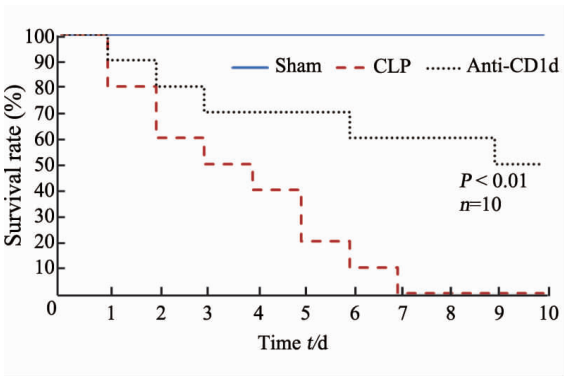


图 4 给予抗-CD1d 抗体后脓毒症小鼠生存率变化  
Fig 4 Survival rate of sepsis mice treated with anti-CD1d blocking antibody

2.5 脓毒症患者外周血 iNKT 细胞比例与细胞因子及病情的相关性 脓毒症患者外周血中 iNKT 细胞比例高于健康对照组  $[(3.67 \pm 1.52)\% \text{ vs } (0.58 \pm 0.29)\%, P < 0.01]$ , 图 5]; 同时, 脓毒症患者外周血血浆中细胞因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平均高于健康对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ; 图 6)。相关性分析结果显示, iNKT 细胞水平分别与 IFN- $\gamma$ 、IL-4 呈正相关 ( $r = 0.607$ ,  $P = 0.005$ ;  $r = 0.649$ ,  $P = 0.002$ ; 图 6), 而与  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 之间无明显相关性。同时, 脓毒症患者外周血 iNKT 细胞比例与 APACHE II 评分也呈正相关 ( $r = 0.605$ ,  $P = 0.005$ , 图 7)。

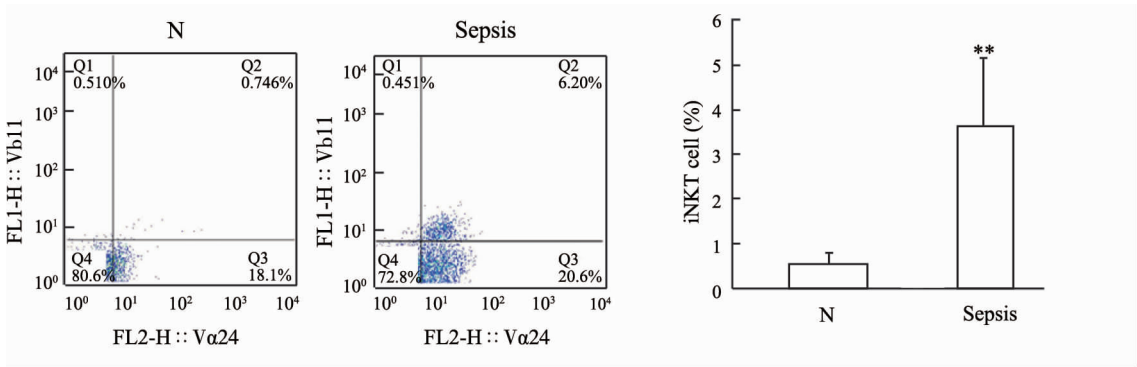


图 5 流式细胞术检测脓毒症患者和健康对照者外周血 iNKT 细胞水平  
Fig 5 Frequencies of peripheral blood iNKT cells detected by flow cytometry in septic patients and healthy volunteers  
iNKT: Invariant natural killer T; N: Healthy volunteers. \*  $P < 0.01$  vs N group.  $n = 20$ ,  $\bar{x} \pm s$

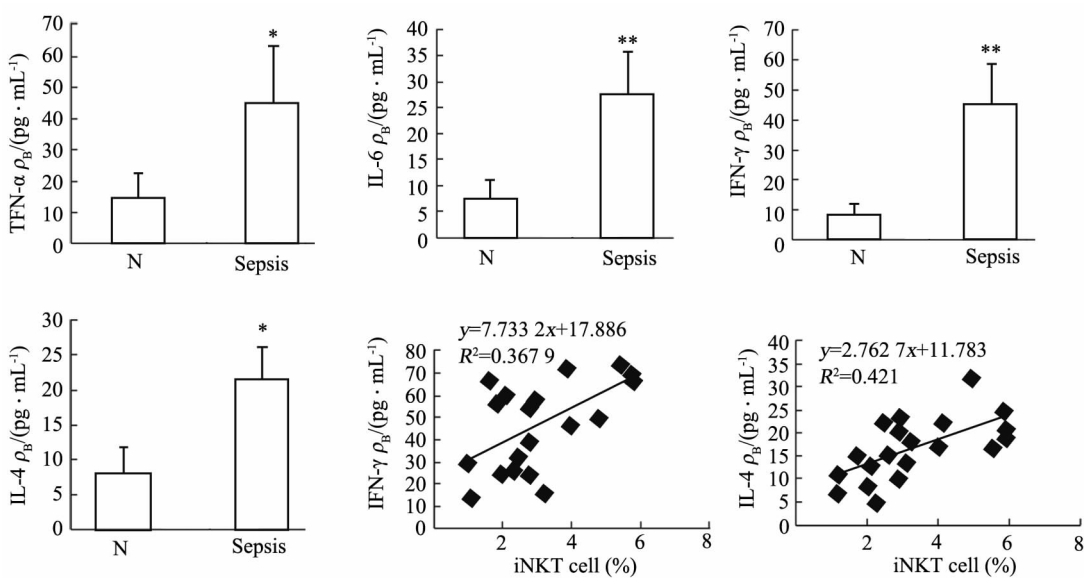


图 6 脓毒症患者外周血细胞因子水平及 iNKT 细胞比例与细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的相关性  
Fig 6 Correlations of peripheral blood iNKT cells proportion and serum levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 in septic patients  
iNKT: Invariant natural killer T; N: Healthy volunteers;  $\text{TNF-}\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL: Interleukin; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs N group.  $n = 20$ ,  $\bar{x} \pm s$

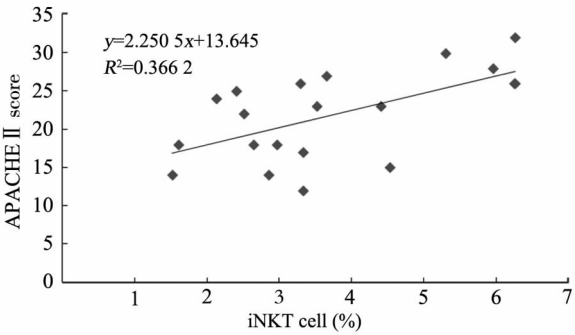


图 7 脓毒症患者外周血 iNKT 细胞比例与 APACHE II 评分的相关性

Fig 7 Correlation of peripheral blood iNKT cell proportion and APACHE II score

iNKT: Invariant natural killer T; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

3 讨论

脓毒症的发病机制极其复杂,其炎症反应是由巨噬细胞、树突状细胞(DC)、T 细胞、NK 细胞等一系列炎性细胞相继激活,释放炎性介质引起级联瀑布样反应,诱发全身炎症反应,最终导致多器官功能障碍综合征(MODS)及死亡<sup>[8]</sup>。

iNKT 细胞是一类天然存在的介导先天免疫和获得性免疫的新型免疫调节细胞,是具有 NK 受体及功能的 T 细胞亚群,其中 TCRV $\alpha$ 1 链高度保守(在人类由 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 和 Vb11 链组成),能特异性识别 CD1d 递呈的糖脂类抗原<sup>[9]</sup>。iNKT 细胞活化后既可以通过分泌多种细胞因子影响 T 细胞、NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的功能,又能够直接杀伤肿瘤细胞等靶细胞<sup>[5]</sup>,是固有免疫系统的重要组成部分之一。iNKT 细胞具有特殊的双向免疫调节作用。iNKT 细胞经经典的外源性刺激剂  $\alpha$ -GalCer 作用活化后可迅速增殖,选择性产生促炎性细胞因子(IFN- $\gamma$  等)或抑炎性细胞因子(IL-4 等),进一步扩大免疫反应,激活下游巨噬细胞、NK 细胞和 DC 等固有免疫细胞,促进 Th1 或 Th2 细胞极化,从而影响免疫应答类型,对纠正免疫系统紊乱和维持免疫环境稳态至关重要<sup>[10]</sup>。近年来研究发现,iNKT 细胞数量和功能的变化在疾病中起着重要作用。iNKT 细胞对假单胞菌、链球菌、螺旋体感染等所导致的脓毒症都起着重要的免疫调节作用,还可影响脓毒症时中性粒细胞对肝脏的损害、抑制单核细胞向巨噬细胞转变及调节巨噬细胞功能<sup>[11]</sup>。基于上述特点,iNKT 细胞越来越受到关注,是近年来研究感染免

疫应答的重要细胞。

本研究结果发现脓毒症早期小鼠和脓毒症患者的 iNKT 细胞都明显增加。iNKT 的激活主要有“直接激活”和“间接激活”两种机制,直接激活途径是病原微生物的胞壁鞘糖脂(GSL)成分与 CD1d 结合后为 iNKT 细胞的 T 细胞受体(TCR)识别<sup>[12]</sup>;间接激活是病原微生物及其产物通过 Toll 样受体激活抗原递呈细胞(APC),进而通过细胞因子等激活 iNKT 细胞<sup>[12-13]</sup>。iNKT 细胞通过 TCR 识别 CD1d 递呈的抗原后大量活化,产生大量细胞因子,这种快速的应答反应可以扩大感染部位的内源性免疫应答,促进炎性因子的释放,给予抗-CD1d 抗体可抑制 iNKT 细胞的直接激活,影响外周血 iNKT 细胞的活化。本研究结果证实,脓毒症小鼠外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平均升高,且外周血 iNKT 细胞水平与细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 呈正相关,给予抗-CD1d 抗体后脓毒症小鼠的外周血、肝脏、胸腺中活化 iNKT 细胞减少,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平下降,由此说明脓毒症早期 iNKT 细胞大量激活,活化 iNKT 细胞与细胞因子分泌关系密切。这种炎性因子的大量释放可能与脓毒症早期器官功能损害相关。

有研究提示,iNKT 细胞缺失的小鼠(V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) 在 CLP 后死亡率可明显下降<sup>[14]</sup>,这可能与 iNKT 细胞活化被抑制后可降低脓毒症导致的“细胞因子风暴”对脏器功能的损害有关。有研究发现在金黄色葡萄球菌内毒素 B 导致的小鼠中毒性休克中,iNKT 细胞活化与死亡率相关,而给予抗-CD1d 抗体部分抑制 iNKT 细胞活化通路却可加速外周血及腹腔中细菌的清除,降低脓毒症小鼠的死亡率,最终影响脓毒症小鼠的疾病病程及预后<sup>[15]</sup>。iNKT 细胞对免疫的双向调节作用在脓毒症早期是以促炎性(IFN- $\gamma$ )还是以抑炎性(IL-4)为主仍不得而知。本研究提示通过抗-CD1d 抗体部分抑制 iNKT 细胞活化通路可减轻脓毒症小鼠细菌负荷,同时减少细胞因子的释放,从而减少机体脏器功能损害,最终使脓毒症小鼠的死亡率降低。这可能与脓毒症早期过度炎症反应导致机体免疫细胞耗竭有一定关系,而抗-CD1d 抗体可部分抑制这种过度炎症反应,从而维持机体细菌清除能力。

临床研究结果同样提示脓毒症患者外周血 iNKT 细胞水平及细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平均增加,且外周血 iNKT 细胞水平与 IFN- $\gamma$ 、IL-4 呈正相关。由此说明,脓毒症早期患者有大量 iNKT 细胞迁移到外周循环中,分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-4 等细胞因子,参与机体免疫应答。本研究还发现,脓

毒症患者外周血 iNKT 细胞比例与患者 APACHE II 评分呈正相关。APACHE II 评分是客观评价危重病患者病情轻重的指标<sup>[16]</sup>。本研究选择脓毒症患者时排除了长期慢性心、肺、肝、肾等重要脏器疾病及长期服用免疫抑制药等对慢性健康评估有影响的患者,主要观察的是脓毒症早期对急性生理功能的影响,避免了其他慢性疾病因素对结果的干扰。结果提示,APACHE II 评分越高的患者,其外周血 iNKT 细胞水平也越高,提示 iNKT 细胞的过度活化导致大量炎性因子释放可引起机体脏器功能损害,从而影响疾病的严重程度及预后。由于临床脓毒症诊断的复杂性,本研究所纳入的脓毒症患者原发病及病情严重程度有所不同,且患者就医时间不同、导致不同患者取样本的时机不一致,加之样本量的局限,都对结果产生一定影响。

本研究初步表明脓毒症早期 iNKT 细胞活化增加,其与炎性因子水平升高以及病情危重情况有一定的相关性,但 iNKT 细胞参与脓毒症免疫应答的具体作用机制仍有待深入研究。

[参考文献]

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, SHANKAR-HARI M, ANNANE D, BAUER M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315: 801-810.

[2] STOLLER J, HALPIN L, WEIS M, APLIN B, QU W, GEORGESCU C, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012[J]. J Crit Care, 2016, 31: 58-62.

[3] HOTCHKISS R S, COOPERSMITH C M, McDUNN J E, FERGUSON T A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression[J]. Nat Med, 2009, 15: 496-497.

[4] LI J, LI M, SU L, WANG H, XIAO K, DENG J, et al. Alterations of T helper lymphocyte subpopulations in sepsis, severe sepsis, and septic shock: a prospective observational study [J]. Inflammation, 2015, 38: 995-1002.

[5] HEFFERNAN D S, MONAGHAN S F, CHUNG C S, CIOFFI W G, GRAVENSTEIN S, AYALA A. A divergent response of innate regulatory T-cells to sepsis in humans: circulating invariant natural killer T-cells are preserved[J]. Hum Immunol, 2014, 75: 277-282.

[6] MOTOHASHI S, OKAMOTO Y, YOSHINO I, NAKAYAMA T. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer[J]. Clin Immunol,

2011, 140: 167-176.

[7] TUDHOPE S J, VON DELWIG A, FALCONER J, PRATT A, WOOLRIDGE T, WILSON G, et al. Profound invariant natural killer T-cell deficiency in inflammatory arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69: 1873-1879.

[8] ROSSAINT J, ZARBOCK A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis[J]. Crit Rev Immunol, 2015, 35: 277-291.

[9] EXLEY M, GARCIA J, BALK S P, PORCELLI S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells[J]. J Exp Med, 1997, 186: 109-120.

[10] TANIGUCHI M, SEINO K, NAKAYAMA T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2003, 4: 1164-1165.

[11] WINTERMEYER P, CHENG C W, GEHRING S, HOFFMAN B L, HOLUB M, BROSSAY L, et al. Invariant natural killer T cells suppress the neutrophil inflammatory response in a mouse model of cholestatic liver damage[J]. Gastroenterology, 2009, 136: 1048-1059.

[12] EMOTO M, SHIMIZU T, KOIKE H, YOSHIKAWA I, HURWITZ R, KAUFMANN S H, et al. Dissociated expression of natural killer 1.1 and T-cell receptor by invariant natural killer T cells after interleukin-12 receptor and T-cell receptor signalling [J]. Immunology, 2010, 129: 62-74.

[13] NAGARAJAN N A, KRONENBERG M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 2007, 178: 2706-2713.

[14] HU C K, VENET F, HEFFERNAN D S, WANG Y L, HORNER B, HUANG X, et al. The role of hepatic invariant NKT cells in systemic/local inflammation and mortality during polymicrobial septic shock[J]. J Immunol, 2009, 182: 2467-2475.

[15] SZABO P A, RUDAK P T, CHOI J, XU S X, SCHAUB R, SINGH B, et al. Invariant natural killer T cells are pathogenic in the HLA-DR4-transgenic humanized mouse model of toxic shock syndrome and can be targeted to reduce morbidity[J]. J Infect Dis, 2017, 215: 824-829.

[16] JIN H, TANG L Q, PAN Z G, PENG N, WEN Q, TANG Y Q, et al. Ten-year retrospective analysis of multiple trauma complicated by pulmonary contusion [J/OL]. Mil Medi Res, 2014, 1: 7. doi: 10.1186/2054-9369-1-7.