

Th1/Th2 平衡在多器官功能障碍综合征发病过程中的变化

沈 贤, 柴 琛, 林富林, 施俊义, 方国恩*

(第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**从 Th1/Th2 平衡角度出发探讨多器官功能障碍综合征(MODS)的发病机制。**方法:**将体质量 22~30 kg 健康雄性家猪随机分为 MODS 组和正常对照组, 每组各 9 只。采用失血性休克复苏+内毒素血症复合因素建立猪 MODS 模型。MODS 组于放血前, 内毒素注射前, 内毒素注射后 1、24、48 及 72 h 留取血标本, 动物死亡后留取脾脏标本。正常对照组同时时间点留取标本。ELISA 法检测血清 IFN- γ 和 IL-4 含量变化; 实时荧光 PCR 法测定脾脏 IFN- γ 、IL-4 mRNA 水平及 Th1/Th2 细胞特异性转录因子 T-bet 和 GATA-3 mRNA 的含量变化。**结果:**内毒素注射后 1 h 血清 IFN- γ 和 IL-4 浓度达到峰值, 后 IFN- γ 浓度下降较快, 内毒素注射后 72 h IFN- γ /IL-4 比值显著低于基础值水平($P=0.000$); MODS 组脾脏 IFN- γ /IL-4 mRNA 比值降低明显, 与对照组比较差异具有显著性($P=0.020$); 脾脏 T-bet/GATA-3 比值也显著低于对照组($P=0.038$)。**结论:** MODS 发生过程中存在 Th1 向 Th2 漂移现象。

[关键词] 多器官功能衰竭; 干扰素 II 型; 白细胞介素 4; 转录因子

[中图分类号] R 365 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1347-04

Changes of Th1/Th2 balance in multiple organ dysfunction syndrome

SHEN Xian, CHAI Chen, LIN Fu-lin, SHI Jun-yi, FANG Guo-en* (Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) with respect to the balance of Th1/Th2. **Methods:** Eighteen healthy male minipigs, weighing 22-30 kg, were randomly divided into two groups: MODS group and control group. Double-hit method including hemorrhagic shock and endotoxemia was used to establish the porcine MODS model. The peripheral vein blood samples were collected at different time-points (before bloodletting, before endotoxin injection, 1 h, 24 h, 48 h and 72 h after endotoxin injection) in the two groups. The spleen samples were collected after death of the animals. Plasma levels of IFN- γ and IL-4 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time PCR was used to detect the expression of IFN- γ , IL-4, T-bet and GATA-3 mRNA (The latter 2 were the key transcription factors associated with Th1/Th2 response) in the spleen samples. **Results:** The plasma levels of IFN- γ and IL-4 quickly reached the peak values 1 h after the endotoxin injection, then the level of IFN- γ decreased quickly. The ratio of IFN- γ /IL-4 was significantly lower than the baseline value 72 h after endotoxin injection ($P=0.000$). The ratio of IFN- γ /IL-4 mRNA in MODS group was obviously lower than that in the control group ($P=0.020$); the ratio of T-bet/GATA-3 was also lower in MODS group ($P=0.038$). **Conclusion:** The shift from Th1 to Th2 occurs in the progress of MODS.

[KEY WORDS] multiple organ failure; interferon type II; interleukin-4; transcription factors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1347-1350]

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是危重病患者死亡的主要原因之一, 由于其发病机制尚未明确, 治疗上缺乏有效的手段。目前认为, 机体免疫失衡可能是导致 MODS 的重要原因^[1], Th1 细胞以分泌 IFN- γ 、IL-2 等促炎细胞因子为特征, 与促炎反应关系密切; Th2 细胞以分泌 IL-4、IL-10 等抗炎细胞因子为特征, 与抗炎反应关系密切, Th1/Th2 平衡实际上反映了机体促炎/抗炎平衡状态。本课题组试图从 Th1/Th2 型细胞因子角度出发观察机体 MODS 发展过程中免疫平衡的变化, 以期探讨 MODS 的发病机制, 为进一步免疫调节治疗寻找有效的免疫监测指标。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 体质量 22~30 kg 健康雄性家猪(第二军医大学实验动物中心)。大肠杆菌内毒素(E. coli O111B4, 第二军医大学基础部微生物学教研室), IFN- γ ELISA 试剂盒、IL-4 ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 反转录试剂盒(Clontech 公司),

[基金项目] 军队“十五”医学研究重点课题(01L006)。Supported by Key Medical Program of the 10th Five-year Plan of PLA(01L006)。

[作者简介] 沈 贤, 博士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: fangguoen@yahoo.com.cn

实时荧光 PCR 试剂 (TaKaRa 公司),引物 (上海生物工程技术有限公司),荧光定量 PCR 仪 (Roche Diagnostics 公司),MK-3 型酶标仪 (Lob-systems Dragon Wellscan)。

1.2 猪 MODS 模型的建立 动物随机分为 MODS 组和正常对照组,每组各 9 只。正常对照组施行假手术,予以股动静脉置管,不实施失血及内毒素注射。MODS 组采用失血性休克复苏+内毒素血症复合因素建立猪 MODS 模型^[2],建模过程分首次打击 (手术创伤+失血性休克+复苏再灌注)、二次打击 (内毒素血症)两个阶段,放血前,内毒素注射前,内毒素注射后 1、24、48 及 72 h 留取血清标本,内毒素注射后 96 h 处死所有存活动物。留取实验过程中死亡和最后处死的所有动物的脾脏标本液氮保存以备 RNA 抽提。正常对照组同时间点留取标本。参照 Hu 等^[3]动物 MODS 诊断标准,用自动分析仪检测平均动脉压 (MAP)、氧分压 (PaO₂)、二氧化碳分压 (PaCO₂)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、尿素氮 (BUN)、肺动脉楔压 (PAWP) 等指标。

1.3 ELISA 法检测猪血清 IFN- γ 和 IL-4 含量 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法定量测定血清 IFN- γ 和 IL-4 水平,严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 实时荧光 PCR 法测定猪脾脏 IFN- γ /IL-4 mRNA 和 T-bet/GATA-3 mRNA 水平 按 Trizol 试剂说明书提取脾脏组织总 RNA,并参照逆转录试剂盒说明书的比例加样,将 RNA 逆转录成 cDNA。按实时 PCR 试剂说明书检测目的基因表达丰度。在预先混合的 RT-PCR 反应液中加入目的基因引

物和 cDNA 模板。目的基因引物为:IFN- γ ,正义 TCA GAT GTA CCT AAT GGT GGA C,反义 TCT TGC TTG ATC ACA TCC ATG C,扩增长度为 170 bp;IL-4,正义 ACG GAC ACA AGT GCG ACA TA,反义 TCA TGC ACG TGT GGT GTC TG,扩增长度为 192 bp;T-bet,正义 CTG TCA ATT GCT TGG GGG AG,反义 TAA GGC TGG GGA ACC ACA TC,扩增长度为 117 bp;GATA-3,正义 CCT GAC CAT GAA GGA AGG,反义 TGT GGC TGG AGT GGC TGA AG,扩增长度为 159 bp。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 s,62 $^{\circ}$ C 20 s,反应 30 个循环。由计算机系统搜集数据,绘制动力学曲线,测定各样品的 Ct 值,与标准曲线进行比较,得出待测样品的初始拷贝数。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件行统计学处理,两组均数比较采用 *t* 检验,MODS 的发生率与死亡率比较采用 Fisher 确切概率法检验。

2 结果

2.1 MODS 发生率及死亡率 MODS 组 MODS 发生率为 88.9% (8/9),死亡率为 87.5% (7/8),大部分 (5 只)于 72~96 h 以内死亡。正常对照组无一只死亡,两组比较具有非常显著性差异 ($P=0.000$)。

2.2 主要器官功能变化 MODS 组死亡前心率明显增快,MAP、PaO₂ 明显下降,PaCO₂、PAWP、AST 及 BUN 均上升明显,与正常对照组比较具有显著性差异 (表 1)。

表 1 两组动物死亡前部分器官功能指标

Tab 1 Indices of main organ functions of animals before death in 2 groups

| Group | <i>n</i> | HR (<i>f</i> /min ⁻¹) | MAP (<i>p</i> /mmHg) | PaO ₂ (<i>p</i> /mmHg) | PaCO ₂ (<i>p</i> /mmHg) | PAWP (<i>p</i> /mmHg) | AST (<i>z</i> _B /U·L ⁻¹) | BUN (<i>c</i> _B /mmol·L ⁻¹) |
|---------|----------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|---|--|
| Control | 9 | 102±6 | 118±9 | 113.2±10.5 | 35.4±3.5 | 7.8±0.8 | 47±12 | 2.1±0.8 |
| MODS | 8 | 140±7** | 87±7** | 90.3±7.7* | 48.5±5.1** | 10.0±1.4* | 221±42** | 4.7±2.6* |

($\bar{x} \pm s$)

HR: Heart rate; MAP: Mean airway pressure; PaO₂: Partial pressure of oxygen in artery; PaCO₂: Partial pressure of carbon dioxide in artery; PAWP: Pulmonary arteriole wedge pressure; AST: Aspartate aminotransferase; BUN: Blood urea nitrogen. 1 mmHg=0.133 kPa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 血浆 Th1/Th2 型细胞因子水平的变化 内毒素注射后血浆 IFN- γ 和 IL-4 浓度均很快达到峰值,后 IFN- γ 浓度下降较快,内毒素注射后 72 h 已下降至放血前水平,而 IL-4 达到峰值后下降不明显,内毒素注射后 72 h 仍维持高水平。IFN- γ /IL-4 比值呈现先升高后下降趋势,内毒素注射后 48 h 已明显

低于放血前水平。见表 2。

2.4 实时定量 PCR 反应 实时定量 PCR 反应得到反映 PCR 扩增过程的 S 形动力学曲线,结合熔解曲线可以判定结果为阳性 (图 1)。

将纯化的产物用 TE 液稀释成 10⁶、10⁵、10⁴、10³ 拷贝数的标准品,由 Light Cyder 软件搜集分析数

据,以梯度稀释的标准品 Ct 值为纵坐标(Y),标准品浓度自然对数为横坐标(X),获得各标准曲线及一元回归方程,IFN- γ : $Y = -3.634X + 35.02$; IL-4:

$Y = -3.634X + 35.02$; GATA-3: $Y = -3.634X + 35.02$; T-bet $Y = -3.487X + 33.64$ 。 $r = -1.00$,表明线性关系良好。

表 2 MODS 组血浆 Th1/Th2 型细胞因子水平的变化
Tab 2 Plasma levels of Th1/Th2 cytokines in MODS group

| Cytokine | $(\bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$ | | | | | |
|---------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 |
| IFN- γ | 28.8 \pm 4.04 | 30.3 \pm 5.18 | 89.5 \pm 8.54** | 66.7 \pm 6.15** | 36.4 \pm 5.26* | 26.2 \pm 3.42 |
| IL-4 | 22.7 \pm 2.81 | 31.1 \pm 3.38** | 39.3 \pm 4.74** | 39.1 \pm 4.74** | 38.4 \pm 4.48** | 38.7 \pm 3.20** |
| IFN- γ /IL-4 | 1.28 \pm 0.25 | 0.99 \pm 0.21 | 2.31 \pm 0.33** | 1.72 \pm 0.22** | 0.96 \pm 0.17* | 0.69 \pm 0.14** |

T1: Before bloodletting; T2: Before injection of endotoxin; T3: 1 h after injection of endotoxin; T4: 24 h after injection of endotoxin; T5: 48 h after injection of endotoxin; T6: 72 h after injection of endotoxin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs T1

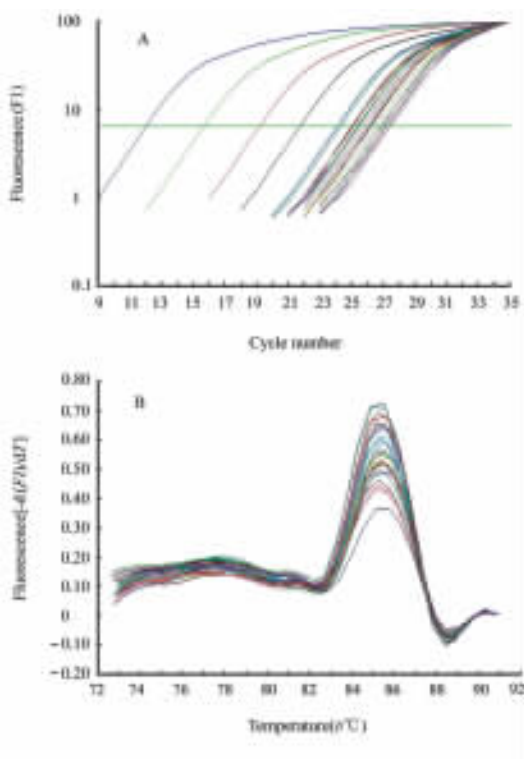


图 1 实时 PCR 扩增曲线(A)和熔解曲线(B)
Fig 1 Amplification curve(A) and deliquesce curve (B) of real-time PCR

2.5 脾脏 Th1/Th2 型细胞因子 mRNA 水平的变化 MODS 组脾脏 IFN- γ 和 IL-4 mRNA 表达量均明显升高,与正常对照组比较具有非常显著性差异; MODS 组 IFN- γ /IL-4 mRNA 比值降低明显,与正常对照组比较具有显著性差异。见图 2。

2.6 脾脏 Th1/Th2 特异性转录因子水平的变化 正常对照组脾脏 T-bet 和 GATA-3 mRNA 表达量普遍较低,MODS 组两者表达量均明显升高,与正常对照组比较具有非常显著性差异。T-bet/GATA-3 比值,MODS 组明显低于正常对照组。见图 3。

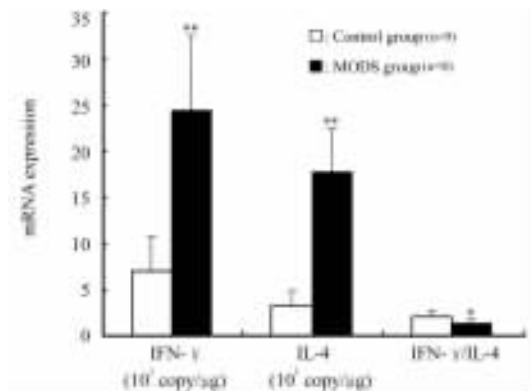


图 2 脾脏 IFN- γ /IL-4 mRNA 表达情况
Fig 2 Expression of IFN- γ /IL-4 mRNA in spleen
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\bar{x} \pm s$

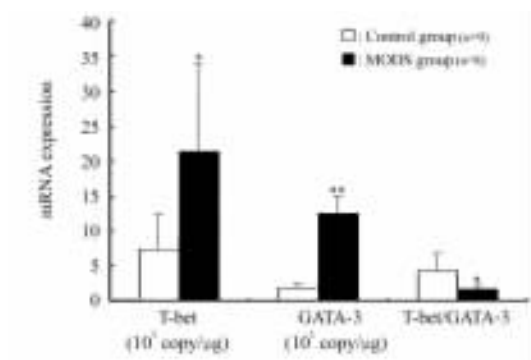


图 3 脾脏 T-bet/GATA-3 mRNA 表达情况
Fig 3 Expression of T-bet/GATA-3 mRNA in spleen
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\bar{x} \pm s$

3 讨论

目前认为,免疫失衡可能是导致 MODS 的本质原因。脓毒症早期炎症反应失控,主要表现为全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),其后果是机体自身组织的破坏,伴随炎症反应的发生,机体内源性抗炎症反应逐步增

强, Bone^[4]将这种抗炎反应概括为抗炎反应综合征 (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS), 其后果是免疫功能低下, 感染易感性增加, 易进展为 MODS, 所以适时了解机体处于何种免疫状态, 给予相应措施, 重建机体免疫系统内稳态尤为重要。Th1/Th2 型细胞因子能够反映机体免疫功能状态, Th1/Th2 型细胞因子作为 SIRS 和 CARS 发病机制的重要环节, 两者的平衡实际上反映了机体促炎与抗炎反应是否平衡^[5]。Pachot 等^[6]研究发现严重脓毒症患者存在 Th2 极化现象; Murphey 等^[7]同样证实盲肠结扎穿孔造成脓毒症模型的大鼠也存在 Th1 向 Th2 漂移现象。

本研究结果显示 IFN- γ /IL-4 比值在内毒素注射后明显升高, 后呈进行性下降趋势, 至内毒素注射后 48 h 已明显低于基础值水平, Th2 型细胞因子 IL-4 所占比重逐渐加大, 说明在 MODS 进展过程中, 存在 Th1 向 Th2 漂移现象。Th2 极化现象的出现可能是机体针对脓毒症早期的炎症反应而发生的保护性的自身调节, 早期的炎症反应过度, 机体 PGE₂、糖皮质激素等免疫抑制介质亦大量分泌^[8-9], 容易造成免疫平衡的失控, 脓毒症晚期免疫麻痹的出现。所以早期遏制过度的炎症反应可能是阻断病程进展的关键。

血浆细胞因子水平很难准确反映脏器组织局部的细胞因子水平, 本实验对机体重要的免疫器官脾脏进行了 Th1/Th2 型细胞因子及特异性转录因子的检测, 结果显示 MODS 组脾脏 IFN- γ /IL-4 mRNA 比值和 T-bet/GATA-3 mRNA 比值均明显降低, 显著低于正常对照组, 说明在 MODS 进展过程中, 脏器组织局部细胞因子和转录因子水平同样存在 Th2 极化现象。T-bet 与 GATA-3 分别作为 Th1 和 Th2 细胞特异性转录因子, 是决定 Th1 和 Th2 极性分化的关键因素, 且两者具有交互抑制作用^[10]。T-bet 选择性地表达于 Th1 细胞, 而在未致敏 CD4⁺ T 细胞及 Th2 细胞中无表达。将 T-bet 基因导入小鼠 T 细胞, 能显著提高 IFN- γ 的表达, 而对 IL-4 的启动子无作用^[11]。GATA-3 选择性地表达于 Th2 细胞, 亦可在早期分化的 Th1 细胞中异位表达, 抑制 Th1 分化, 使 IL-4 等 Th2 细胞因子分泌增加, 而 IFN- γ 等 Th1 细胞因子分泌减少^[12]。许多学者也对多种疾病患者进行了 Th1/Th2 型细胞因子和 T-bet/GATA-3 的检测, 对它们相互之间的关系进行了探讨^[6,13]。结果表明: T-bet 正调节 Th1 型细胞因子; GATA-3 正调节 Th2 型细胞因子, T-bet/GATA-3 比率较单一 T-bet 或 GATA-3 的水平更能客观地反映 Th1/Th2 分化。

综上所述, 免疫失衡可能是导致 MODS 的重要原因, Th1/Th2 型细胞因子在一定程度上可以反映出机体的免疫功能状态, 通过 Th1/Th2 平衡的监测, 了解机体处于何种免疫状态, 选择适当的时机, 针对免疫功能低下探索有效的免疫调节措施, 遏制 Th1 向 Th2 漂移, 恢复 SIRS/CARS 平衡, 这可能是防治 MODS 的重要方向。

[参考文献]

- [1] Bone R C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)[J]. *Ann Intern Med*, 1996, 125:680-687.
- [2] 姚宁, 方国恩, 杜成辉, 等. 猪多器官功能障碍模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22:108-109.
- [3] Hu S, Sheng Z Y, Zhou B T, et al. Study on delay two-phase multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Chin Med J*, 1998, 111:101-108.
- [4] Bone R C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)[J]. *Ann Intern Med*, 1996, 125:680-687.
- [5] Becker Y. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers—a review and hypothesis[J]. *Virus Genes*, 2004, 28:5-18.
- [6] Pachot A, Monneret G, Voirin N, et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock[J]. *Clin Immunol*, 2005, 114:61-69.
- [7] Murphey E D, Herndon D N, Sherwood E R. Gamma interferon does not enhance clearance of *Pseudomonas aeruginosa* but does amplify a proinflammatory response in a murine model of post-septic immunosuppression [J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 6892-6901.
- [8] Harizi H, Juzan M, Pitard V, et al. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions[J]. *J Immunol*, 2002, 168:2255-2263.
- [9] Deroo B J, Archer T K. Glucocorticoid receptor activation of the I κ B α promoter within chromatin[J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12:3365-3374.
- [10] von Andrian U H, Mackay C R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343: 1020-1034.
- [11] Szabo S J, Kim S T, Costa G L, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. *Cell*, 2000, 100:655-669.
- [12] Jenks S A, Eisfelder B J, Miller J. LFA-1 co-stimulation inhibits Th2 differentiation by down-modulating IL-4 responsiveness [J]. *Int Immunol*, 2005, 17:315-323.
- [13] Wang T T, Zhao H, Guo J H, et al. Type 1 and Type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Haematologica*, 2005, 90:914-923.

[收稿日期] 2007-03-24

[修回日期] 2007-09-29

[本文编辑] 曹静