

免疫检查点 VISTA 分子对脓毒症小鼠免疫炎症反应的调节作用

陶天柱^{1,2}, 张国荣², 杨晓明¹, 郭青³, 刘珺⁴

摘要 目的 探讨 B7 家族新成员 T 细胞激活抑制物免疫球蛋白可变区结构域 (VISTA) 在脓毒症小鼠淋巴细胞中的表达变化及其可能的免疫调节作用。方法 采用流式细胞术检测脓毒症小鼠外周血和脾脏 T 淋巴细胞中 VISTA 的表达变化;给予脓毒症小鼠尾静脉注射抗 VISTA 抗体 (MH5A) 或同型对照抗体,观察小鼠生存期、外周血细胞因子、细菌负荷和脾脏淋巴细胞凋亡的变化。结果 小鼠外周血和脾脏中的 T 淋巴细胞上 VISTA 分子表达丰富,盲肠结扎穿孔 (CLP) 术后 24 h 未见 VISTA 表达升高,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);MH5A 抗体可以改善脓毒症小鼠 7 d 生存期 (8/12 只 vs 2/12 只, $P = 0.01$),减少脾脏淋巴细胞的凋亡 [$(30\ 123 \pm 6\ 400)$ vs $(45\ 482 \pm 8\ 652)$, $P = 0.03$],降低小鼠外周血和腹腔细菌负荷,下调促炎性细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和干扰素- γ (IFN- γ) 的表达,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论

免疫检查点 VISTA 是调控脓毒症时淋巴细胞凋亡和炎症反应的重要靶点,激活 VISTA 信号通路可能为脓毒症免疫治疗提供新的方向。

关键词 免疫检查点;脓毒症;炎症反应;细胞凋亡

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0193-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.006

脓毒症是机体对感染的免疫反应失控引起的致命性器官功能损害,是危重病患者死亡的重要原因^[1]。流行病学研究^[2]显示全球每年因脓毒症死亡的病例达到 600 万,严重脓毒症的病死率高达 25%~30%。脓毒症早期机体在病原微生物和代谢产物刺激下,产生大量的促炎性炎症因子和氧自由基。随着脏器保护和替代治疗技术的不断完善,脓

毒症患者多能度过过度炎症反应期,而进入长期的免疫抑制状态^[3]。V 区 Ig 抑制子 (V-domain Ig suppressor of T-cell activation, VISTA),也被称为程序性死亡因子同源物 (programmed death 1 homolog, PD-1H),主要表达于 T 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞表面。既往研究^[4]发现,VISTA 分子在抑制淋巴细胞过度活化和维持免疫稳态的过程中发挥重要作用。该文拟通过尾静脉注射抗 VISTA 抗体 (MH5A),探讨在体激活 VISTA 信号通路对脓毒症小鼠免疫功能的调节作用及治疗价值。

1 材料与方法

1.1 脓毒症小鼠模型建立 雄性 8~12 周龄的 C57BL/6 小鼠共 80 只,体质量 20~30 g,由海军军医大学实验动物中心提供。小鼠适应性饲养 1 周,于术前 12 h 禁食,随机数字表法分为盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 组和假手术 (Sham) 组。经腹部正中切口暴露盲肠,沿距离远端 1 cm 处结扎,使用 18G 穿刺针对穿盲端,轻轻挤出少量肠道内容物,将盲肠还纳腹腔后间断缝合腹膜和皮肤,皮下注射生理盐水 1 ml。假手术组仅暴露盲肠,不给予结扎或穿孔操作。本实验中的动物处理方法符合动物伦理学标准,经空军特色医学中心伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂 别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的抗小鼠 CD4 抗体,异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗小鼠 CD8 抗体,藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗小鼠 VISTA 抗体,抗 VISTA 激动型抗体 (克隆号:MH5A) 和同型对照抗体 (克隆:HTK888) 均购自美国 Biolegend 公司。小鼠细胞因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的 ELISA 试剂盒均购自美国 BD Bioscience 公司。脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 检测试剂盒购自美国 Chemicon 公司。

1.3 单克隆抗体注射治疗 将 CLP 小鼠随机分为

2021-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81701964)

作者单位:空军特色医学中心¹ 麻醉科、² 疼痛科、⁴ 研究部,北京 100142

³ 武警特色医学中心研究部,北京 102613

作者简介:陶天柱,男,博士,主治医师;

刘珺,女,副主任技师,责任作者, E-mail: maggi8256@sina.com

抗体治疗组 (MH5A) 和同型对照抗体组 (Isotype), 每组 8 只, 分别于 CLP 术前 2 h 给予治疗组尾静脉注射 100 μg 抗 VISTA 抗体, 对照组 100 μg 同型对照抗体。

1.4 流式细胞术检测 T 淋巴细胞 VISTA 表达变化 收集 CLP 或 Sham 术后 24 h 的外周血和脾脏, 研磨小鼠脾脏制备单细胞悬液, 裂红液处理后离心去上清液。PBS 重悬制备单细胞悬液, 加入 APC 标记的 CD4 抗体, FITC 标记的 CD8 抗体和 PE 标记的 VISTA 抗体, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤去上清液后, 上机检测。

1.5 ELISA 检测小鼠外周血细胞因子表达 收集小鼠外周血离心取上清液, 按照 ELISA 试剂盒操作步骤逐步加样检测细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IFN-γ 的表达。

1.6 小鼠腹腔和外周血细菌负荷测定 收集小鼠外周血稀释至 10³ 或 10⁵ 倍, 制备 100 μl 悬液; 使用 2 ml 无菌 PBS 灌洗小鼠腹腔, 收集灌洗液稀释 10⁵ 或 10⁷ 倍, 制备悬液。将稀释后的血和灌洗液均匀涂抹至琼脂糖平板, 于 37℃ 温箱孵育 24 h 后计数菌落形成单位 (CFU)。

1.7 TUNEL 染色检测脾脏细胞凋亡 制备小鼠脾

脏石蜡切片, 缓冲液孵育后, 加入末端脱氧核苷酸转移酶和 dUTP 地高辛染色。37℃ 孵育 1 h 后停止反应。清洗切片, 然后加入抗地高辛过氧化物酶溶液。切片用 DAB/H₂O₂ 染色, 双苯甲酰胺复染。高倍显微镜下计数 10 个视野中染色阳性的细胞平均数。

1.8 小鼠 7 d 生存期观察 将小鼠随机分为 Sham 组、CLP 组、CLP + 抗 VISTA 抗体组和 CLP + 对照抗体组, 每组 12 只。抗 VISTA 抗体组给予抗 VISTA 抗体 100 μg, 对照抗体组给予同型对照抗体 100 μg, 其余组别给予 100 μl 生理盐水, 观察术后 7 d 各组小鼠的生存期。

1.9 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 Mann-Whitney 检验, 多重比较采用 Tukey 后检验进行校正。生存期的组间比较采用 Log-rank 检验。统计学分析均采用 Prism6.0 (Graph-Pad software), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症小鼠淋巴细胞 VISTA 表达变化 如图 1 和表 1 所示, sham 和 CLP 组小鼠外周血和脾脏中 CD4⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞均表达丰富的 VISTA 分子, 但各组间 VISTA 平均荧光强度 (mean fluores-

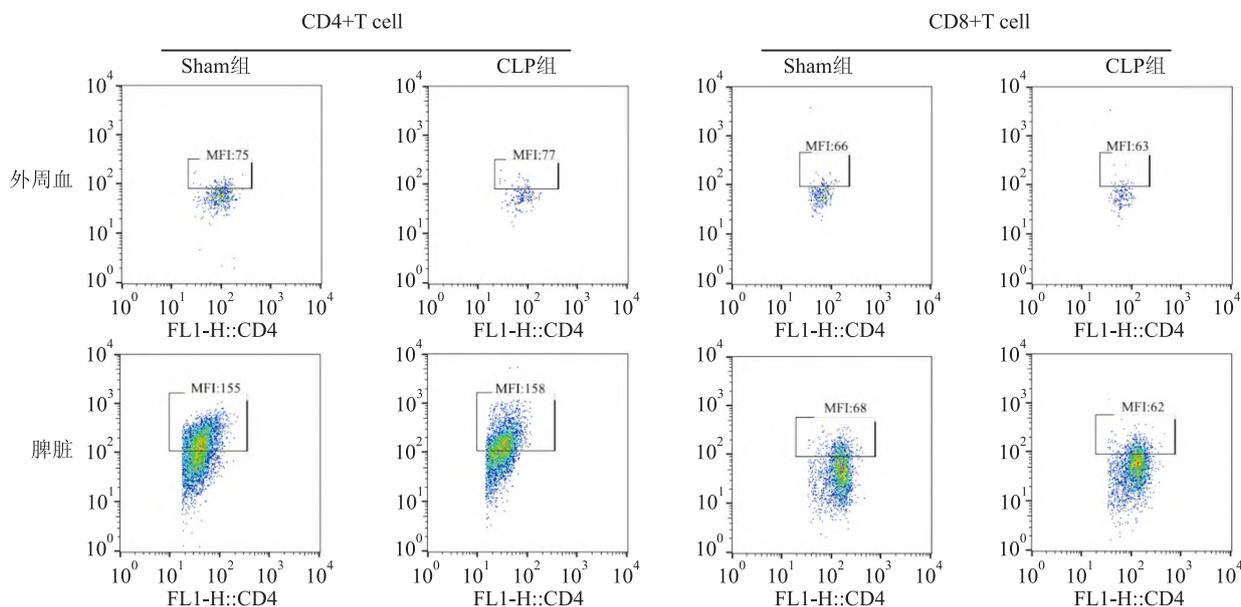


图 1 脓毒症小鼠外周血和脾脏 T 淋巴细胞 VISTA 表达变化
MFI: 平均荧光强度

表 1 脓毒症小鼠外周血和脾脏 T 淋巴细胞 VISTA 表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

项目	外周血 (MFI)				脾脏 (MFI)			
	Sham 组	CLP 组	t 值	P 值	Sham 组	CLP 组	t 值	P 值
CD4 ⁺ T 细胞	72.3 ± 11.6	75.2 ± 14.2	0.35	0.73	152.6 ± 22.5	159.2 ± 25.6	0.43	0.68
CD8 ⁺ T 细胞	65.1 ± 10.4	60.2 ± 14.5	0.61	0.56	66.7 ± 12.4	63.8 ± 9.8	0.41	0.69

cence intensity, MFI) 比较差异均无统计学意义。

2.2 MH5A 抗体治疗可以显著降低脓毒症小鼠的死亡率 分别于术前 2 h 在体给予抗 VISTA 抗体或同型对照抗体,观察各组小鼠的 7 d 生存期,结果显示:CLP 组为 16.7% (2/12), CLP + 抗 VISTA 抗体组 66.7% (8/12), 组间差异有统计学意义 ($P = 0.01$)。见图 2。

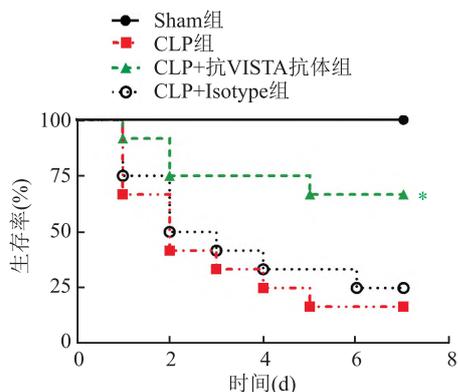


图2 抗 VISTA 抗体改善脓毒症小鼠 7 d 生存期
与 CLP 组比较: * $P < 0.05$

2.3 抗 VISTA 抗体抑制促炎性反应,并降低细菌负荷 如表 2 所示,与 CLP 组相比,抗体治疗组促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IFN- γ 的表达水平降低,差异有统计学意义;同时,外周血和腹腔灌洗液培养后细菌集落的数量减少,提示抗体治疗组小鼠的细菌清除能力改善。

2.4 抗 VISTA 抗体减少脓毒症小鼠脾脏淋巴细胞

凋亡 TUNEL 染色显示,CLP 术后 24 h 小鼠脾脏中的凋亡细胞数增加(图 3),差异有统计学意义。与对照组相比,抗 VISTA 抗体治疗后脾脏中的细胞凋亡数量减少,差异有统计学意义($30\ 123 \pm 6\ 400$ vs $45\ 482 \pm 8\ 652, P = 0.03$),提示抗 VISTA 抗体可以抑制淋巴细胞的凋亡。

3 讨论

随着脓毒症病理生理机制研究的不断深入,调控免疫炎症紊乱已经成为治疗脓毒症的新方向。既往研究^[5]证实,脓毒症时淋巴细胞的数量、功能和表型均发生显著变化,且与患者的病情严重程度和预后密切相关。免疫检查点分子是调节淋巴细胞的功能的重要靶点,阻断程序性死亡分子(PD-1)/程序性死亡分子受体配体(PD-L1)或细胞毒性 T 细胞相关抗原(CTLA-4)都可以改善淋巴细胞的功能,对脓毒症小鼠发挥保护作用^[6-8]。本文通过在体给予 MH5A 抗体显示,调控 VISTA 通路可以减少淋巴细胞的凋亡,抑制机体炎症反应,改善细菌清除能力,从而改善脓毒症小鼠生存期。

多项尸检研究^[9]显示,在脓毒症死者的诸多脏器中观察到免疫细胞如 T 细胞、树突状细胞和 B 细胞的大量凋亡,且免疫细胞中的免疫检查点分子表达上调。与其他 B7 家族的检查点分子不同,VISTA 在对照组小鼠淋巴细胞中表达丰富,而 CLP 术后 24 h 未见显著的升高,提示 VISTA 信号通路在免疫炎症反应的启动阶段即可发挥明显的调节作用。

表 2 抗 VISTA 抗体降低脓毒症小鼠外周血细胞因子和细菌负荷($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

项目	Sham 组	CLP 组	CLP + 抗 VISTA 抗体组	CLP + Isotype 组	q 值	P 值
TNF- α (ng/L)	72.0 \pm 6.4	361.2 \pm 149.4	106.5 \pm 14.4 *	330.1 \pm 102.3	6.6	0.001 5
IL-1 β (ng/L)	12.4 \pm 2.2	110.2 \pm 19.5	53.5 \pm 12.6 *	102.4 \pm 15.8	9.0	<0.000 1
IL-6 (ng/L)	15.2 \pm 2.2	115.4 \pm 22.5	43.2 \pm 12.6 *	110.1 \pm 32.1	7.8	0.000 2
IFN- γ (ng/L)	12.3 \pm 2.5	55.2 \pm 14.8	26.5 \pm 4.2 *	52.1 \pm 11.2	6.7	0.001 2
外周血 CFU (10^3 /ml)	0	52.2 \pm 21.0	21.5 \pm 8.3 *	48.2 \pm 15.1	5.1	0.01
灌洗液 CFU (10^6 /ml)	0	60.2 \pm 21.5	18.6 \pm 8.3 *	54.2 \pm 13.0	7.2	0.000 5

与 CLP 组比较: * $P < 0.05$

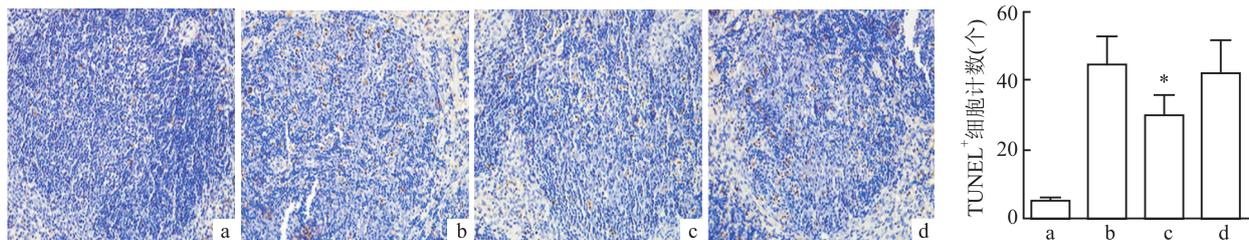


图3 抗 VISTA 抗体抑制脓毒症小鼠脾脏淋巴细胞凋亡 TUNEL 染色 $\times 400$

a: Sham 组; b: CLP 组; c: CLP + 抗 VISTA 抗体组; d: CLP + Isotype 组; 与 CLP 组比较: * $P < 0.05$

Wang et al^[4]发现,在未活化的淋巴细胞中加入重组 VISTA Ig 分子片段,对淋巴细胞的凋亡没有显著影响。课题组在本研究中观察到激活 VISTA 信号通路可以减少 CLP 小鼠脾脏淋巴细胞的凋亡,但在假手术组给予 MH5A 抗体对细胞凋亡并无显著影响(结果未报道),提示 VISTA 对淋巴细胞凋亡的调节作用与细胞自身的活化状态可能相关。MH5A 抗体减少淋巴细胞凋亡可能还受到其他因素的间接影响,如促炎性细胞因子 TNF- α 的分泌减少和细菌负荷的降低。

脓毒症早期过度的炎症反应是导致免疫细胞凋亡和重要脏器直接损害的关键因素。本研究观察到 MH5A 抗体可以显著降低促炎性细胞因子的产生,其可能的机制包括以下 3 个方面:① 淋巴细胞细胞因子分泌减少。大量研究^[4,10-12]证实,VISTA 是负性调控 T 淋巴细胞免疫反应的靶点,利用重组 VISTA Ig 分子片段或激活型抗 VISTA 抗体活化信号通路可以负性调节淋巴细胞的功能,抑制细胞因子如 IL-2 和 IFN- γ 的产生。而 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子在单核巨噬细胞过度活化的过程中均发挥一定作用,切断 T 细胞来源细胞因子的产生可以间接抑制单核巨噬细胞的活化,降低全身的炎症反应。② VISTA 对髓样细胞的直接作用。VISTA 可以同时表达于淋巴细胞和髓样细胞,发挥受体和配体的双重作用,但 VISTA 对髓样细胞的调节作用目前研究结论尚不一致。Bharaj et al^[13]在 HIV 感染的患者中研究发现,单核细胞过表达 VISTA 后可以自发性分泌促炎性细胞因子如 IL-6、IL-8、TNF- α 和 IL-1 β 。不同的是,Han et al^[14]发现,与淋巴细胞的调节作用相似,VISTA 也可以负性调节中性粒细胞和浆细胞样 DC 分泌细胞因子的功能。VISTA 分子对髓样细胞功能的调节作用和机制尚需进一步研究证实。③ 细菌负荷的降低。细菌负荷和机体炎症反应的程度可以互为因果,当细菌负荷降低时,病原微生物和代谢产物对免疫细胞的刺激减少,细胞因子的产生随之减少。理论上,VISTA 抑制淋巴细胞的凋亡可以保护获得性免疫反应的能力,促进细菌的清除,降低全身和局部的细菌负荷。

综上,本研究显示免疫检查点 VISTA 分子是调节脓毒症免疫炎症反应的重要靶点,MH5A 抗体可以阻断淋巴细胞凋亡途径,抑制炎症因子,降低细菌负荷,从而对脓毒症小鼠发挥重要保护作用。但本研究仅从在体研究着手,存在不足之处,后续研究将进一步阐明 VISTA 对纯化的淋巴细胞亚群和单核

巨噬细胞的调节作用,为脓毒症免疫紊乱的机制研究提供借鉴,并为脓毒症的免疫调节治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Rhodes A, Evans L E, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. *Crit Care Med*, 2017, 45(3): 486-552.
- [2] Xie J, Wang H, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: A national cross-sectional survey [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(3): e209-18
- [3] Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(2):121-37.
- [4] Wang L, Rubinstein R, Lines J L, et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 577-92.
- [5] Hutchins N A, Unsinger J, Hotchkiss R S, et al. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(4):224-33.
- [6] Fallon E A, Biron-Girard B M, Chung C S, et al. A novel role for coinhibitory receptors/checkpoint proteins in the immunopathology of sepsis[J]. *J Leukocyte Biol*, 2018, 10.1002/JLB.2MIR0917-377R.
- [7] Zhang Y, Zhou Y, Lou J, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction [J]. *Crit Care*, 2010, 14(6): R220.
- [8] Wakeley M E, Gray C C, Monaghan S F, et al. Check point inhibitors and their role in immunosuppression in sepsis [J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36(1):69-88.
- [9] Garofalo A M, Lorente-Ros M, Goncalvez G, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis [J]. *Intens Care Med* Exp, 2019, 7(Suppl 1):45.
- [10] Wang L, Le Mercier I, Putra J, et al. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41):14846-51.
- [11] Lines J L, Pantazi E, Mak J, et al. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(7): 1924-32.
- [12] Liu J, Yuan Y, Chen W, et al. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(21): 6682-7.
- [13] Bharaj P, Chahar H S, Alozie O K, et al. Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109103.
- [14] Han X, Vesely M D, Yang W et al. PD-1H (VISTA)-mediated suppression of autoimmunity in systemic and cutaneous lupus erythematosus [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(522): eaax1159.

(下转第 202 页)

PCR was used to detect the expression levels of KLF7, APN, IL-6, and TNF- α mRNA in EAT. Human THP-1 cells were cultured in vitro and induced into M1 type macrophages and 3T3-L1 preadipocytes. The cells were divided into 3 groups: KLF7 up-regulated group (transfected with KLF7 mimic), KLF7 down-regulated group (transfected with siRNA knockdown KLF7), NC group (transfected oligopeptide sequence), transfected two kinds of cells. qRT-PCR was used to detect the expression of APN, MCP-1, IL-6 and TNF- α mRNA in M1 type macrophages, and the protein expression levels of key factors in the NF- κ B signaling pathway were detected by Westren blot. The qRT-PCR method was used to detect APN, KLF4, IL-6, MCP-1 mRNA and adipocyte differentiation marker peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in 3T3-L1 preadipocytes 24 h after transfection. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), fatty acid binding protein 4 (FABP4) mRNA relative expression levels, and Westren blot was used to detect protein expression levels. **Results** Compared with the non-CAD group, the expression of CAD group decreased, APN decreased, IL-6 and TNF- α increased significantly, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). KLF7 was highly expressed in human THP-1 derived M1 macrophages induced by inflammatory stimuli (LPS). In M1 macrophages derived from human THP-1, knocking down KLF7 could inhibit the release of inflammatory factors. Transfection with KLF7-siRNA could significantly inhibit LPS-induced phosphorylation of JNK-MAPKs, the level of p-p65 and the activation of p-I κ Ba ($P < 0.05$). In 3T3-L1 preadipocytes, upregulation of KLF7 increased the expression of adipocyte differentiation markers PPAR γ , C/EBP α , FABP4 mRNA, and promoted the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of KLF7 in EAT in CAD patients increases. KLF7 activates the activation of macrophages mediated by the JNK-NF-KB signaling pathway in EAT, promotes inflammation in EAT in CAD patients, and promotes the differentiation and maturation of adipocytes, thereby promoting the development of CAD. It indicates that KLF7 may be a potential therapeutic target for cardiovascular diseases (such as CAD).

Key words coronary heart disease; epicardial adipose tissue; KLF7; macrophages; inflammation

(上接第 196 页)

Immune checkpoint VISTA has a role in the modulation of immune response in septic mice

Tao Tianzhu^{1,2}, Zhang Guorong², Yang Xiaoming¹, Guo Qing³, Liu Jun⁴

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Pain Medicine, ⁴Dept of Research, Air Force Medical Center, Beijing 100142;

³Research Dept of Special Medical Center of Armed Police, Beijing 102613)

Abstract Objective To determine expression profile of VISTA on lymphocyte and the potential regulatory effects on immune response in a murine model of sepsis. **Methods** Expression profile of VISTA on T lymphocytes in the spleen and peripheral blood was examined. Mice were intravenously injected with an agonistic VISTA mAb (MH5A) or isotype control, and then the survival rate, cytokine expression, bacterial burden and lymphocyte apoptosis were determined. **Results** VISTA was substantially expressed on T cell from the spleen and peripheral blood, septic peritonitis did not induce significant changes in the expression profiles at 24h post surgery ($P > 0.05$ in each comparison). Treatment with MH5A improved the survival of septic mice (8/12 vs 2/12, $P = 0.01$), accompanied by reduced lymphocyte apoptosis [(30 123 \pm 6 400) vs (45 482 \pm 8 652), $P = 0.03$], decreased bacterial burden and lessened cytokines expression, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β and IFN- γ ($P < 0.05$ in each comparison). **Conclusion** The present study identified VISTA as a novel immune checkpoint in the regulation of T cell apoptosis and inflammatory response during sepsis. VISTA agonism might offer a promising approach in the immunotherapy for sepsis.

Key words immune checkpoint; sepsis; inflammatory response; apoptosis