

PD-1 对小鼠内毒素血症的保护作用及其机制研究

杨丽芬¹ 何芳¹ 章坚² 尹飞¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 美国芝加哥大学附属医院肾内科, 伊利诺伊州 芝加哥 60637)

[摘要] **目的** 革兰阴性细菌感染所致的多器官衰竭/功能障碍综合征仍是目前发达国家和发展中国家儿童死亡的主要原因之一, 发病机制尚不明确。本研究探讨了具有负性免疫调节作用的免疫球蛋白超家族的成员程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 对革兰阴性细菌的主要致病成分脂多糖 (LPS) 所致内毒素血症的保护作用及可能的相关机制。**方法** PD-1^{+/+} 和 PD-1^{-/-} 小鼠各 10 只经腹腔注射 LPS (10 mg/kg), 观察其 72 h 存活情况; 另对 PD-1^{+/+} 和 PD-1^{-/-} 小鼠各 40 只经腹腔注射 LPS (5 mg/kg), 分别在注射前 (0 h) 及注射后 1.5、3、6 h 采血, 用 ELISA 检测血浆中多种炎性成分的含量。**结果** PD-1^{-/-} 小鼠在接受大剂量 LPS 注射后, 存活率明显低于 PD-1^{+/+} 小鼠。注射 5 mg/kg LPS 后, PD-1^{-/-} 小鼠生成的具有促炎作用的介质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 及 IL-17 高于 PD-1^{+/+} 小鼠。**结论** PD-1 对 LPS 所致的内毒素血症具有保护作用, 可能是通过调节炎性成分的生成来实现的。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12 (10): 812-815]

[关键词] 内毒素血症; 基因敲除; 程序性死亡受体-1; 小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0812-04

Protection of PD-1 against LPS-induced endotoxemia and the underlying mechanism

YANG Li-Fen, HE Fang, Jian ZHANG, YIN Fei. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yin F, Email: yf2323@hotmail.com)

Abstract: Objective Gram-negative bacteria-induced multiple organ failure/dysfunction syndrome (MOF/MODS) is one of the leading causes of death through the world. The member of immunoglobulin family programmed death-1 (PD-1) is a negative immune regulator. This study investigated the protective effect of PD-1 as well as the underlying mechanism in LPS-induced endotoxemia. **Methods** Ten PD-1^{+/+} and ten PD-1 knockout (PD-1^{-/-}) mice were injected peritoneally with LPS (10 mg/kg), and the survival was observed within 72 hrs after LPS injection. The other 40 PD-1^{+/+} and 40 PD-1^{-/-} mice were injected peritoneally with LPS (5 mg/kg). Blood samples were collected before injection and 1.5, 3 and 6 hrs after LPS injection ($n=10$ each time point). Serum levels of various inflammatory mediators were measured using ELISA. **Results** The survival rate in PD-1^{-/-} mice was noticeably lower than that in PD-1^{+/+} mice after 10 mg/kg LPS injection. Serum levels of inflammatory mediators TNF- α , IL-1 β , IL-12 and IL-17 in PD-1^{-/-} mice were higher than those in PD-1^{+/+} mice after 5 mg/kg LPS injection. **Conclusions** PD-1 can protect mice from LPS-induced endotoxemia probably through its regulation on inflammatory mediator production. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (10): 812-815]

Key words: Gene knockout; Endotoxemia; Programmed death-1; Mice

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性细菌的细胞壁组成成分, 于细菌死亡解体后释放。LPS 进入机体后, 激活体内的单核/巨噬系统, 诱导生成大量的前炎症细胞因子 (proinflammatory cytokines)、趋化因子 (chemokines)、生长因子 (growth factors) 和其他因子如白细胞介素 (interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等。这些炎性物质在适量的情况下能有效地参与机体的抗感染免疫, 然而反应过度则损伤机体, 引起全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、感染性休克 (septic shock) 甚至致死性的多器官衰竭/功能障碍综合征 (multiple organ failure/dysfunction syndrome, MOF/MODS) 等^[1-2]。程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 是免疫球蛋白超家族的一个成员, 表达在活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和树突状细胞表面^[3-5]。PD-1 被

[收稿日期] 2010-06-15; [修回日期] 2010-07-16
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30872790/H0908) 和中国国家留学基金委资助 (项目编号: [2007] 3020)。
[作者简介] 杨丽芬, 女, 博士研究生。
[通信作者] 尹飞, 教授。

认为在免疫反应中起重要的抑制作用,PD-1 基因敲除的小鼠患有自身免疫性疾病^[6-8],但目前对 PD-1 的研究主要集中在其对适应性免疫(adaptive immunity)尤其是对 T 细胞功能的影响上,且具体机制尚不清楚;PD-1 在 LPS 所致的内毒素血症中的作用未见报道。本研究就 PD-1 是否参与调节 LPS 所致的内毒素血症及其可能机制进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用 PD-1 基因敲除小鼠购自美国杰克逊公司,用 RT-PCR、Westernblot 检测,获取合格的野生型(PD-1^{+/+})和基因敲除纯合子(PD-1^{-/-}),所得 8~10 周龄雌性小鼠体重 22~27 g 用于本实验。精制大肠杆菌内毒素即脂多糖(lipopolysaccharide, LPS,0111:B4 血清型),购自美国 Sigma 公司,用无菌生理盐水配制成 1 mg/mL 的溶液, -20℃ 保存。各种炎症介质检测所用的 ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 存活率的观察 取健康雌性 PD-1^{+/+} 和 PD-1^{-/-} 小鼠各 10 只,按 10 mg/kg 的剂量经腹腔注射 LPS,观察 LPS 注射后 0、12、24、36、48、60、72 h 小鼠存活率^[9-10]。

1.2.2 标本采集 取健康雌性 PD-1^{+/+} 和 PD-1^{-/-} 小鼠各 40 只,两组按照注射 LPS 后采血时间不同,分成 0、1.5、3、6 h 等 4 个亚组($n=10$)。其中 0 h 组为不注射 LPS 的对照组,其余各组按 5 mg/kg 的剂量经腹腔注射 LPS,在相应时间点用 CO₂ 麻醉小鼠,用一次性采血管经眼窝采血约 500~600 μ L/只,于常温 1 500 rpm 离心 15 min,上层清亮的淡黄色血浆 -80℃ 保存。

1.2.3 炎性介质的检测 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、IL-17、IL-6、角质细胞起源趋化因子(KC)、巨噬细胞炎症蛋白 1- α (MIP-1 α)均采用 ELISA 检测。按试剂盒说明的浓度配制一抗,100 μ L/孔包被平底 96 孔板,置于 4℃ 冰箱过夜。用含 0.25% Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗板 5 次,向板内加入试剂盒自带的封闭液 200 μ L/孔,室温封闭 1 h。倒掉封闭液,洗板 5 次,向板内加入稀释好的标准品或样品,室温孵育 2 h。倒掉板内液体,洗板 5 次,按说明配制二抗,向板内加入二抗 100 μ L/孔,室温孵育 1 h。倒掉板内液体,洗板 5 次,向板内加入 Avidin-

HRP,室温孵育 30 min,洗板 7 次,加入底物 TMB 显色 15 min,于 570 nm 和 450 nm 读数,用 OD570-OD450 差值根据所得的标准曲线计算结果。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 进行数据统计。生存率采用 Kaplan-Meier 统计学方法进行分析,ELISA 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Student t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 72 h 存活率

PD-1^{-/-} 小鼠的存活率明显低于 PD-1^{+/+} 小鼠。前者在 24 h 内即出现死亡,48 h 死亡小鼠进行性增加,至 72 h 实验小鼠全部死亡。而野生型在 48 h 内出现第 1 批死亡小鼠,至 72 h 死亡数量有所增加,但存活率仍有 40%。相同实验条件重复两次实验,所得趋势一致。可见,PD-1 基因敲除小鼠对 LPS 诱导的内毒素血症更敏感,PD-1 具有一定的保护作用。

2.2 血清 TNF- α 的变化

注射 LPS 之前,PD-1^{+/+} 和 PD-1^{-/-} 小鼠血清中的 TNF- α 水平很低。接受 LPS 1.5 h 后,TNF- α 水平迅速升高,至 3 h、6 h 后有所回落,且 PD-1^{-/-} 小鼠血清中的 TNF- α 在 1.5 h($t=-4.372, P=0.000$)和 6 h($t=-5.775, P=0.000$)均高于相同时间点 PD-1^{+/+} 小鼠(表 1)。

2.3 血清 IL-1 β 的变化

两组的血清中 IL-1 β 在注射 LPS 之前及之后 1.5 h 均检测不到,注射后 3 h 明显升高,6 h 维持在较高水平。PD-1^{-/-} 组在 LPS 注射 6 h 后血清中 IL-1 β 的水平显著高于 PD-1^{+/+} 组($t=-4.369, P=0.000$)(表 1)。

2.4 血清 IL-12 的变化

两组血清中 IL-12 在 LPS 注射 1.5 h 后开始增高,3 h 后达最高峰,6 h 时有所下降。PD-1^{-/-} 组在 LPS 注射 6 h 后血清中 IL-12 的水平显著高于 PD-1^{+/+} 组($t=-5.245, P=0.000$)(表 1)。

2.5 血清 IL-17 的变化

两组小鼠 IL-17 在 LPS 注射之前及之后 1.5 h 均检测不到,3 h 有所上升,6 h 持续上升,其中 PD-1^{-/-} 组达 PD-1^{+/+} 小鼠的 10 倍以上($t=-7.867, P=0.000$)(表 1)。

表 1 注射 LPS 后血浆多种细胞因子的浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

炎症介质	基因型	时间点 (h)			
		0	1.5	3	6
TNF-α	PD-1 ^{+/+}	18.4 ± 14.3	1 278 ± 140	391 ± 239	137 ± 39
	PD-1 ^{-/-}	11.3 ± 1.8	2 181 ± 638 ^a	567 ± 259	253 ± 50 ^a
IL-1β	PD-1 ^{+/+}	—	—	59.6 ± 42.3	50 ± 22
	PD-1 ^{-/-}	—	—	97.5 ± 46.7	140 ± 62 ^a
IL-12	PD-1 ^{+/+}	243.7 ± 46.7	893 ± 323	12 983 ± 5 652	4 863 ± 990
	PD-1 ^{-/-}	207.5 ± 75.8	1 953 ± 985	1 4932 ± 6 087	6 907 ± 735 ^a
IL-17	PD-1 ^{+/+}	—	—	165 ± 32	191 ± 71
	PD-1 ^{-/-}	—	—	391 ± 286	2 147 ± 783 ^a
KC	PD-1 ^{+/+}	—	3 762 ± 808	4 729 ± 814	4 917 ± 539
	PD-1 ^{-/-}	—	4 516 ± 350	3 975 ± 1 128	4 602 ± 113
IL-6	PD-1 ^{+/+}	—	1 539 ± 932	3 128 ± 456	2 914 ± 114
	PD-1 ^{-/-}	—	1 958 ± 713	1 904 ± 565	3 326 ± 89
MIP-1α	PD-1 ^{+/+}	76.3 ± 45.2	959 ± 748	4 802 ± 2 954	547 ± 116
	PD-1 ^{-/-}	55.3 ± 13.2	1 792 ± 1 579	3 401 ± 1 370	410 ± 52

a: 与 PD-1^{+/+} 同一时间点相比较, $P < 0.01$

2.6 其他介质

同时检测的其他介质如 KC、IL-6、MIP-1α 等在接受 LPS 后 1.5、3、6 h 后均上升,但两组之间差异无统计学意义(表 1)。IL-10、IL-13 在各时间点均未能测出。

3 讨论

尽管在诊断和治疗方法上已取得了巨大的进步,败血症仍是发达和发展中国家导致死亡最主要的原因之一,而革兰阴性杆菌感染是其中最主要的一部分^[11-12]。作为革兰阴性杆菌的主要致病成分, LPS 在细菌死亡解体后释放入血,与分布在单核/巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞、淋巴细胞等表面的 Toll-样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4) 结合,通过髓性分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88) -依赖性或非依赖性途径,最终活化 NF-κB 或丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径,生成大量的炎症介质^[13]。其中这些炎症介质中既有促炎成分如 TNF-α、IL-1β、IL-12、IFN-γ、IL-17、IL-6、KC、MIP-1α、HMGB1 等,促进机体发生炎症反应以清除病原体;又有抗炎因子如 IL-10、TGF-β、IL-13 等抑制过度的炎症反应以避免对机体自身的免疫损伤^[13-16]。

PD-1 是 CD28 家族的一个成员,与另一辅助抑制分子细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) 享有

23% 的同源性^[17-18]。PD-1 可被诱导性地表达在活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和树突状细胞表面^[3-5],与其配体 PD-L1、PD-L2 相结合而对淋巴细胞的活化产生抑制作用。PD-1 的负性免疫调节作用首先在 PD-1 基因敲除的小鼠中体现出来,它被认为参与调控机体外周免疫耐受。B6 背景的 PD-1 基因敲除的小鼠患有狼疮样-肾小球肾炎和关节炎^[6],而 BALB/c 背景的 PD-1 基因敲除小鼠则患有致死性自身免疫性扩张性心肌病^[7-8]。有研究发现,人类 PD-1 的单核苷酸多态性(SNP) 与系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、I 型糖尿病有关^[19-21]。

本研究用革兰阴性杆菌的主要致病成分 LPS 诱导小鼠内毒素血症模型,研究了 PD-1 对内毒素血症的保护作用及其可能的相关机制,发现在接受大剂量的 LPS 注射后,PD-1^{-/-}小鼠的死亡出现时间明显早于 PD-1^{+/+}小鼠,且其总体的死亡速度要显著快于 PD-1^{+/+}小鼠,提示 PD-1 对于 LPS 诱导的内毒素血症具有保护作用。本研究还发现在接受 LPS 注射后 6 h 内两组小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-12、IL-17、IL-6、KC、MIP-1α 已明显升高,且 PD-1^{-/-}小鼠血清内 TNF-α、IL-1β、IL-12 和 IL-17 的含量均高于 PD-1^{+/+}小鼠,提示 PD-1 能抑制 LPS 诱导的促炎因子的生成。TNF-α 由巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞生成,能促进炎症及内皮细胞活化;IL-1β 由巨噬细胞、上皮细胞产生,能促进 T 细胞及巨噬细胞的活化;IL-12 由巨噬细胞及树突状细胞生成,能活化 NK 细胞,诱导 CD4 T 细胞的分化进而促进适应性免疫

反应;IL-17 由 Th17、CD8 T 细胞,NK 细胞, $\gamma\delta$ T 细胞和中性粒细胞产生,能诱导细胞多种炎症因子的生成。PD-1 基因敲除后,内毒素诱导的上述多种炎症成分均显著增多,提示 PD-1 可能是通过参与调控各种炎症介质的生成、影响炎症/抗炎介质间的平衡来实现其对 LPS 诱导的内毒素血症的保护作用。

由于上述介质在短时间内的生成主要与天然免疫(innate immunity)有关,因而检测 PD-1 在该系统中的细胞如单核/巨噬细胞、树突状细胞中的功能有助于进一步明确其保护机制。PD-1 对内毒素血症的保护作用是否具有组织器官特异性则有赖于进一步的肺、肝、肾等器官的病理检查。PD-1 对内毒素血症保护机制的阐明将由革兰氏阴性细菌感染所致的败血症、感染性休克及相关的多器官功能衰竭的诊治提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9453): 63-78.

[2] Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure [J]. *Mol Med Today*, 1999, 5 (3): 123-132.

[3] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.

[4] Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8 (3): 239-245.

[5] Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance [J]. *Trends Immunol*, 2002, 22 (5): 265-268.

[6] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor [J]. *Immunity*, 1999, 11 (2): 141-151.

[7] Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsui T, Mizoguchi A, Wang J, et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (12): 1477-1483.

[8] Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice [J]. *Science*, 2001, 291 (5502): 319-322.

[9] Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock [J]. *J Exp Med*, 2006, 203 (1): 131-140.

[10] Bachmaier K, Toya S, Gao X, Triantafyllou T, Garrean S, Park GY, et al. E3 ubiquitin ligase Cblb regulates the acute inflammatory response underlying lung injury [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (8): 920-926.

[11] Wynn J, Cornell TT, Wong HR, Shanley TP, Wheeler DS. The host response to sepsis and developmental impact [J]. *Pediatrics*, 2010, 125 (5): 1031-1041.

[12] Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (19): 1804-1813.

[13] Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells [J]. *Immunol Res*, 2007, 39 (1-3): 249-260.

[14] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 197-216.

[15] 郭萌, 李冠民, 黄清泉. 细菌内毒素研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 397-401.

[16] 陈洁, 姜虹. TLR4 信号通路与炎症反应 [J]. *医学综述*, 2009, 15(19): 2902-2904.

[17] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. *EMBO J*, 1992, 11 (11): 3887-3895.

[18] Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27 (4): 195-201.

[19] Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de FU, Wiman B, Prince J, et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50 (6): 1770-1773.

[20] Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes [J]. *Tissue Antigens*, 2003, 62 (6): 492-497.

[21] Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Alarcon-Riquelme M, et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52 (4): 1058-1062.

(本文编辑:王庆红)