

· 论著 · 脏器损害与并发症 ·

血必净注射液及其组分芍药苷对脓毒症大鼠免疫功能和生存率的影响



姚人骐 任超 王丽雪 董宁 吴瑶 姚咏明

解放军总医院第四医学中心、医学创新研究部创伤研究中心, 北京 100048

通信作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com

【摘要】 目的 探讨血必净注射液(简称血必净)与其组分芍药苷对脓毒症大鼠脾脏调节性 T 细胞(Treg)免疫功能及大鼠生存率的影响。方法 (1)免疫磁珠法分离提纯 3 只 9~12 周龄 SD 雄性大鼠(鼠龄、品系、性别下同)脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺T 细胞。按照随机数字表法(分组方法下同)将 CD4⁺CD25⁺Treg 分为空白对照组、单纯 CD3/CD28 组、单纯内毒素/脂多糖(LPS)组、LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组,每组 6 孔。单纯 CD3/CD28 组、单纯 LPS 组、LPS + 血必净组及 LPS + 芍药苷组细胞采用加入 1.25 μg CD3 和 2.5 μg CD28 的含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h 后,单纯 LPS 组、LPS + 血必净组及 LPS + 芍药苷组细胞加入 1 μg/mL LPS 1 μL,并立即在 LPS + 血必净组细胞中加入 5 mg/mL 血必净 1 μL,在 LPS + 芍药苷组细胞中加入 80 μmol/L 芍药苷 1 μL,均继续培养 72 h。空白对照组细胞加入等体积含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 96 h。采用流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺Treg 的细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)及叉头翼状螺旋转录因子 3(Foxp3)表达、CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 CD4⁺CD25⁺Treg 培养上清液中白细胞介素 10(IL-10)水平。将 CD4⁺T 细胞分为空白对照组、单纯 CD3/CD28'组、单纯 LPS'组、LPS + 血必净'组、LPS + 芍药苷'组,每组 6 孔,加入前述相应组处理后 CD4⁺CD25⁺Treg 共培养 72 h 后,流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞增殖活性,ELISA 法检测 CD4⁺T 细胞培养上清液中 IL-4 水平。(2)将 120 只大鼠分成假手术组、单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组和脓毒症 + 芍药苷组,每组 30 只。单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组和脓毒症 + 芍药苷组大鼠采取盲肠结扎穿孔术构建脓毒症模型,假手术组大鼠单纯开腹模拟手术。脓毒症 + 血必净组大鼠术后经尾静脉注射血必净 4 mL/kg,2 次/d;脓毒症 + 芍药苷组大鼠术后经尾静脉注射芍药苷 978 μg,2 次/d。分别观察并记录术后 1、2、3、4、5、6、7 d 的 4 组大鼠生存率,并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。对数据行单因素方差分析、LSD-*t* 检验,对生存曲线行 Log-rank(Mantel-Cox)检验。结果 (1)与空白对照组比较,单纯 LPS 组 CD4⁺CD25⁺Treg 的 CTLA-4、Foxp3 表达水平明显升高($t = 27.19, 17.00, P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-10 水平明显升高($t = 40.76, P < 0.01$)。与单纯 LPS 组比较,LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组 CD4⁺CD25⁺Treg 的 CTLA-4、Foxp3 表达水平明显降低($t_{LPS+血必净组} = 31.03, 11.27, t_{LPS+芍药苷组} = 5.79, 5.64, P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-10 水平明显降低($t = 15.49, 4.20, P < 0.01$)。与空白对照组比较,单纯 LPS 组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率明显下降($t = 6.02, P < 0.01$);与单纯 LPS 组比较,LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率明显增加($t = 20.32, 8.60, P < 0.01$)。(2)与单纯 CD3/CD28'组比较,单纯 LPS'组 CD4⁺T 细胞增殖率明显降低($t = 22.47, P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-4 水平明显升高($t = 3.51, P < 0.01$)。与单纯 LPS'组比较,LPS + 血必净'组、LPS + 芍药苷'组 CD4⁺T 细胞增殖率均明显增加($t = 16.31, 11.48, P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-4 水平无明显变化。(3)假手术组、单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组、脓毒症 + 芍药苷组大鼠术后 7 d 生存率分别为 100% (30/30)、30% (9/30)、57% (17/30)、47% (14/30)。与单纯脓毒症组比较,脓毒症 + 血必净组大鼠术后 7 d 内生率明显升高($\chi^2 = 4.34, P < 0.05$),脓毒症 + 芍药苷组大鼠术后 7 d 内生率无明显变化。结论 血必净及其组分芍药苷均能逆转脓毒症介导的大鼠 Treg 免疫抑制功能上调及凋亡抵抗,并改善效应性 T 细胞增殖能力。芍药苷对脓毒症大鼠生存率的改善效应明显弱于血必净。

【关键词】 脓毒症; 免疫; T 淋巴细胞,调节; 血必净注射液; 芍药苷**基金项目:**国家重点研发计划(2017YFC1103302);国家自然科学基金(81730057、81801935)

DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00246

Influence of Xuebijing injection and its component paeoniflorin on immune function and survival rate of septic rats

Yao Renqi, Ren Chao, Wang Lixue, Dong Ning, Wu Yao, Yao Yongming

Trauma Research Center, Fourth Medical Center and Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Yao Yongming, Email: c_ff@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the influence of Xuebijing injection (hereinafter referred to as Xuebijing) and its component paeoniflorin on immune function of regulatory T cells (Tregs) of spleen and survival rate of septic rats. **Methods** (1) CD4⁺CD25⁺Tregs and CD4⁺T cells were isolated and purified from spleens of three 9 to 12 weeks old Sprague-Dawley male rats (the same age, breed, and gender below) by immunomagnetic beads. According to the random number table (the same grouping method below), CD4⁺CD25⁺Tregs were divided into blank control group, simple CD3/CD28 group, simple endotoxin/lipopolysaccharide (LPS) group, LPS + Xuebijing group, and LPS + paeoniflorin group, with 6 wells in each group. The cells in simple CD3/CD28 group, simple LPS group, LPS + Xuebijing group, and LPS + paeoniflorin group were cultured in RPMI 1640 medium containing fetal bovine serum in volume fraction of 10%, 1.25 μg CD3, and 2.5 μg CD28 for 24 hours. Then 1 μg/mL LPS in the volume of 1 μL was added to the cells in simple LPS group, LPS + Xuebijing group, and LPS + paeoniflorin group. Moreover, 5 mg/mL Xuebijing in the volume of 1 μL and 80 μmol/L paeoniflorin in the volume of 1 μL were added to the cells in LPS + Xuebijing group and LPS + paeoniflorin group, respectively, which were cultured for another 72 hours. Cells in blank control group were routinely cultured in RPMI 1640 medium containing fetal bovine serum in volume fraction of 10% for 96 hours. The expressions of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and forkhead wing-link transcription factor 3 (Foxp3) and apoptosis of CD4⁺CD25⁺Tregs were measured by flow cytometry. The interleukin-10 (IL-10) level from culture supernatant of CD4⁺CD25⁺Tregs was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CD4⁺T cells were divided into blank control' group, simple CD3/CD28' group, simple LPS' group, LPS + Xuebijing' group, and LPS + paeoniflorin' group, with 6 wells in each group. After being cocultured with the corresponding CD4⁺CD25⁺Tregs treated as before for 72 hours, the proliferative activity of CD4⁺T cells was measured by flow cytometry, and IL-4 level from culture supernatant of CD4⁺T cells was determined by ELISA. (2) One hundred and twenty rats were divided into sham surgery group, simple sepsis group, sepsis + Xuebijing group, and sepsis + paeoniflorin group, with 30 rats in each group. The septic rat model was reproduced by cecal ligation and puncture surgery in simple sepsis group, sepsis + Xuebijing group, and sepsis + paeoniflorin group. In sham surgery group, the rats were only performed with laparotomy to simulate surgery. In sepsis + Xuebijing group, the rats were given post-surgical injection of 4 mL/kg Xuebijing through tail vein, twice a day. In sepsis + paeoniflorin group, the rats received 978 μg paeoniflorin via tail vein, twice a day. The survival rates of rats in the four groups on post surgery day 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 were observed and recorded. The surviving curve of Kaplan-Meier was drawn. Data were statistically analyzed with one-way analysis of variance, least significant difference *t* test. The surviving curve was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) test. **Results** (1) Compared with those in blank control group, the expressions of CTLA-4 and Foxp3 of CD4⁺CD25⁺Tregs (*t* = 27.19, 17.00, *P* < 0.01) and IL-10 level from culture supernatant (*t* = 40.76, *P* < 0.01) were significantly increased in rats in simple LPS group. Compared with those in simple LPS group, the expressions of CTLA-4 and Foxp3 of CD4⁺CD25⁺Tregs (*t*_{LPS + Xuebijing group} = 31.03, 11.27, *t*_{LPS + paeoniflorin group} = 5.79, 5.64, *P* < 0.01) and IL-10 level from culture supernatant (*t* = 15.49, 4.20, *P* < 0.01) was significantly decreased in LPS + Xuebijing group and LPS + paeoniflorin group. Compared with that in blank control group, the apoptosis rate of CD4⁺CD25⁺Tregs in simple LPS group was significantly declined (*t* = 6.02, *P* < 0.01). Compared with the rate in simple LPS group, the apoptosis rates of CD4⁺CD25⁺Tregs in LPS + Xuebijing group and LPS + paeoniflorin group were significantly increased (*t* = 20.32, 8.60, *P* < 0.01). (2) Compared with those in simple CD3/CD28' group, the proliferative rate of CD4⁺T cells was significantly decreased in simple LPS' group (*t* = 22.47, *P* < 0.01), while IL-4 level from culture supernatant was significantly elevated (*t* = 3.51, *P* < 0.01). Compared with those in simple LPS' group, the proliferative rates of CD4⁺T cells in LPS + Xuebijing' group and LPS + paeoniflorin' group were significantly increased (*t* = 16.31, 11.48, *P* < 0.01), while IL-4 level from culture supernatant showed no obvious change. (3) The post-operative 7-day survival rates of rats in sham surgery group, simple sepsis group, sepsis + Xuebijing group, sepsis + paeoniflorin group were 100% (30/30), 30% (9/30), 57% (17/30), and 47% (14/30), respectively. Compared with that in simple sepsis group, the survival rate within post-operative 7-day of rats in sepsis + Xuebijing group was significantly higher ($\chi^2 = 4.34$, *P* < 0.05), while the survival rate within post-operative 7-day of rats in sepsis + paeoniflorin group showed no obvious change. **Conclusions** Both Xuebijing and its component paeoniflorin are capable of reversing sepsis-induced inhibitory immune function

and apoptotic resistant of Tregs in rats, and further improving the proliferative activity of T cells. In addition, the effect of paeoniflorin on improvement of survival rate of rats with sepsis is weaker than Xuebijing.

【Key words】 Sepsis; Immunity; T-lymphocytes, regulatory; Xuebijing injection; Paeoniflorin

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1103302); National Natural Science Foundation of China (81730057, 81801935)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn501120-20200430-00246

根据 2016 年脓毒症新定义,脓毒症是由于机体对于感染反应失控引起的致命性器官功能障碍^[1],其病情凶险、致死率高,是 ICU 患者死亡的主要原因^[2]。脓毒症对固有免疫及适应性免疫细胞数量及功能均有不同程度的影响,以适应性免疫应答为例,发生脓毒症时 B 淋巴细胞及效应性 T 细胞凋亡增加、数量减少,并呈现出向抗炎表型极化的现象,导致机体对感染的应答无力甚至麻痹^[3]。然而,免疫负向调控细胞如调节性 T 细胞(Treg),在脓毒症中呈现凋亡抵抗及活性增强,从而加重机体免疫功能抑制^[4]。业已明确,Treg 比例增加是脓毒症时 T 淋巴细胞增殖受限和功能失衡的主要原因之一,抑制 Treg 功能则能逆转机体免疫抑制状态,显著增加脓毒症动物生存率,提示基于 Treg 功能调节的免疫调理措施可能是改善脓毒症免疫应答及脓毒症患者预后的有效手段^[5-6]。

血必净注射液(简称血必净),属于化解毒类中药,是由王今达教授以血府逐瘀汤为基础,在“菌毒炎并治”理论指导下,根据“三证三法”辨证原则研制而成的一种静脉注射液,临床广泛用于脓毒症或因感染诱发的 SIRS 的治疗^[7]。该药由红花、丹参、赤芍、川芎、当归 5 味中药组成,具有拮抗细菌内毒素、抑制炎症因子过度释放、防止凝血功能障碍、保护血管内皮细胞、改善组织微循环及免疫功能等作用。多中心临床试验和荟萃分析结果表明,血必净能有效改善患者全身炎症反应、凝血功能并对多器官功能发挥保护效应,显著降低脓毒症患者 28 d 病死率^[7-8]。值得注意的是,血必净因其抗炎及器官保护效应在近期全球暴发大流行的新型冠状病毒肺炎的救治中被《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》推荐用于重型患者的治疗^[9]。芍药苷是血必净中含量最高的单体成分,属于赤芍的单萜糖苷类化合物,具清热凉血、散瘀止痛之效,在调节氧化应激、凝血功能、炎症反应及免疫效应等方面发挥重要作用。此外,芍药苷因作用广泛、药效快及毒性低等特点,在糖尿病、心血管系统疾病、肿瘤及神经退行性疾病的治疗中发挥重要作用^[10]。本研究以 Treg 功能及数量调节为切入点,比较血必净与其主

要组分芍药苷对脓毒症状态下大鼠免疫功能及生存率的影响,为血必净的进一步研发及临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

本实验方案由解放军总医院第四医学中心实验动物伦理委员会审核批准。

1.1 动物及主要试剂与仪器来源

123 只健康清洁级 9~12 周龄 SD 雄性大鼠,体质量(220±20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SYXK(军)2012-0014。大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司,CD4⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 磁珠分选试剂盒及 MiniMACS 型免疫磁珠分选仪购自德国 Miltenyi Biotec 公司。LPS 购自美国 Sigma 公司,血必净购自天津红日药业股份有限公司,芍药苷购自上海同田生物技术股份有限公司。别藻蓝蛋白(APC)标记的小鼠抗大鼠细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)单克隆抗体、藻红蛋白-花青素 7(PE-Cy7)标记的抗大鼠叉头翼状螺旋转录因子 3(Foxp3)单克隆抗体均购自美国 eBioscience 公司,异硫氰酸荧光素(FITC)-膜联蛋白 V/碘化丙啶细胞凋亡检测试剂盒、流式细胞仪购自美国 BD 公司,CFSE 试剂盒购自美国 Biolegend 公司,大鼠 IL-4 和 IL-10 ELISA 检测试剂盒均购自上海依科赛生物制品有限公司。Spectra MR 型全波长酶标仪购自美国 Dynex 公司。

1.2 CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺T 细胞分离及提纯

将 3 只大鼠脱颈处死,乙醇棉球消毒腹部皮肤 3 遍,开腹取出脾脏,置于预冷 PBS 中。用镊子撕碎脾脏,无菌注射器活塞于无菌不锈钢筛网上研磨脾脏,制成细胞悬液,以离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 7 min,弃上清液。加入适量 PBS 重新悬浮,沿着管壁缓慢加至等体积淋巴细胞分离液的上层,以离心半径 10 cm,3 000 r/min 离心 15 min 后收集中间云雾状细胞悬液并计数。加入清洗液,以离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 7 min,弃上清液,加入 PBS 重新悬浮备用。CD4⁺T 细胞分选:每 1×10⁷ 个脾脏核细胞加入 20 μL CD4⁺T 细胞分选磁珠,4 ℃

孵育 15 min, 加入 PBS 洗涤后重新悬浮, 采用 LS 分选柱于免疫磁珠分选仪中分离得到 $CD4^+ T$ 细胞。 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 分选: 每 1×10^7 个 $CD4^+ T$ 细胞加入 1 μ L APC 标记的抗大鼠 CD25 单克隆一抗, 4 $^\circ$ C 避光孵育 15 min, 每 1×10^7 个 $CD4^+ T$ 细胞加入 20 μ L 抗 APC 磁珠和 80 μ L PBS, 充分重新悬浮, 4 $^\circ$ C 孵育 15 min; PBS 洗涤后重新悬浮, LS 分选柱磁性分选得到 $CD25^+ T$ 细胞。将得到的 $CD25^+ T$ 细胞计数, 按每 1×10^7 个细胞加入 20 μ L 解离剂, 4 $^\circ$ C 孵育 10 min 后, 按每 1×10^7 个细胞加入 20 μ L 抗 $CD4^+$ 磁珠和 30 μ L 终止剂; 4 $^\circ$ C 孵育 15 min, PBS 洗涤后重新悬浮, LS 分选柱磁性分选得到 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 。

1.3 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 分组及处理

将 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 用适量含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重新悬浮 (细胞浓度为 2.5×10^6 个/mL) 后, 以每孔 1 mL 细胞悬液接种于 6 孔板中。按照随机数字表法 (分组方法下同) 将 6 孔板中的细胞分为空白对照组、单纯 CD3/CD28 组、单纯 LPS 组、LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组。单纯 CD3/CD28 组、单纯 LPS 组、LPS + 血必净组及 LPS + 芍药苷组细胞加入含 1.25 μ g CD3 和 2.5 μ g CD28 及体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 (含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL 及 L-谷氨酰胺, 以下称完全培养基), 置于体积分数 5% 二氧化碳培养箱中 37 $^\circ$ C 培养 24 h 后, 单纯 LPS 组、LPS + 血必净组及 LPS + 芍药苷组细胞加入 1 μ L 质量浓度 1 μ g/mL LPS, 并立即在 LPS + 血必净组细胞中加入 1 μ L 质量浓度 5 mg/mL 血必净、在 LPS + 芍药苷组细胞中加入 1 μ L 物质的量浓度 80 μ mol/L 芍药苷, 均继续培养 72 h。空白对照组细胞加入等体积不含 CD3 或 CD28 的完全培养基培养 96 h。

1.4 流式细胞术检测 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 的 CTLA-4 及 Foxp3 表达

收集 1.3 中各组 6 孔 $CD4^+ CD25^+ Treg$, PBS 洗涤 2 次后重新悬浮, 加入 APC 标记的小鼠抗大鼠 CTLA-4 单克隆抗体, 4 $^\circ$ C 避光孵育 30 min, 加入破膜剂过夜。加入破膜缓冲液洗涤细胞 3 次, 弃上清液后加入 PE-Cy7 标记的抗大鼠 Foxp3 单克隆抗体, 室温避光孵育 30 min, 破膜缓冲液洗涤细胞, 弃上清液后 10 g/L 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测 CTLA-4 及 Foxp3 表达, 其中 CTLA-4 的表达以百分比表示, Foxp3 表达以平均荧光强度表示。

1.5 流式细胞术检测 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 凋亡情况

收集 1.3 中各组 6 孔 $CD4^+ CD25^+ Treg$, PBS 洗

涤 2 次后弃上清液, 按照 FITC-膜联蛋白 V/碘化丙啶细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作, 采用流式细胞仪检测 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 凋亡情况。

1.6 ELISA 法检测 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 培养上清液中 IL-10 水平

收集 1.3 中各组 6 孔 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 培养上清液, 按照大鼠 IL-10 ELISA 检测试剂盒说明书步骤操作, 采用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值, 并通过标准曲线所得方程计算 IL-10 水平。

1.7 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 与 $CD4^+ T$ 细胞共培养及 $CD4^+ T$ 细胞增殖活性检测

将 1.2 中的 $CD4^+ T$ 细胞用 PBS 重新悬浮, 调整浓度为 1×10^7 个/mL, 取 1 μ L CFSE 储存液, 加至 1 mL 细胞悬液中, 室温避光孵育 20 min, 加入 5 倍体积完全培养基孵育 5 min。离心弃上清液后完全培养基重新悬浮细胞 (浓度 2.5×10^6 个/mL), 接种于 96 孔板中于体积分数 5% 二氧化碳培养箱中 37 $^\circ$ C 培养 24 h, 分为空白对照'组、单纯 CD3/CD28'组、单纯 LPS'组、LPS + 血必净'组、LPS + 芍药苷'组, 每组 6 孔。加入 1.3 中相应组处理后 $CD4^+ CD25^+ Treg$ 共培养 72 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤后重新悬浮, 流式细胞仪检测 $CD4^+ T$ 细胞增殖活性。

1.8 ELISA 法检测 $CD4^+ T$ 细胞培养上清液中 IL-4 水平

收集 1.7 中共培养体系上清液按照大鼠 IL-4 ELISA 检测试剂盒说明书步骤操作, 采用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值, 并通过标准曲线所得方程计算 IL-4 水平。

1.9 脓毒症大鼠模型制备及生存率观察

将 120 只大鼠分成假手术组、单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组和脓毒症 + 芍药苷组, 每组 30 只。对单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组和脓毒症 + 芍药苷组大鼠术前禁食 12 h, 称取体质量后编号, 采用 50 g/L 水合氯醛以 8 mL/kg 腹腔注射麻醉, 采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 术构建脓毒症模型。术毕于大鼠颈部皮下予 40 mL/kg 生理盐水补液, 保持室温恒定。假手术组大鼠开腹暴露盲肠后直接还纳腹腔, 不结扎或穿孔, 其余步骤同单纯脓毒症组大鼠。脓毒症 + 血必净组大鼠在 CLP 术后经尾静脉注射血必净 4 mL/kg, 2 次/d。用生理盐水将芍药苷标准品配制成 1.222 6 mg/mL 溶液, 脓毒症 + 芍药苷组大鼠在 CLP 术后经尾静脉注射芍药苷 978 μ g, 2 次/d。单纯脓毒症组及假手术组大鼠在术后均经尾静脉注射生理盐水 4 mL/kg, 2 次/d。分别观察并记录术后

1、2、3、4、5、6、7 d 的 4 组大鼠生存率,并且绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析,计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间总体比较行单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。计数资料采用例(百分比)表示,对生存曲线进行 Log-rank (Mantel-Cox) 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净及其组分芍药苷对 LPS 刺激下 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫功能的影响

与空白对照组比,单纯 LPS 组 CD4⁺CD25⁺Treg 的 Foxp3、CTLA-4 表达水平明显升高 ($P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-10 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与单纯 LPS 组比较,LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组 CD4⁺CD25⁺Treg 的 Foxp3、CTLA-4 表达水平明显降低 ($P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与空白对照组比较,单纯 LPS 组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率明显下降 ($P < 0.01$);与单纯 LPS 组比较,LPS + 血必净组、LPS + 芍药苷组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 各组 CD4⁺CD25⁺Treg 对 CD4⁺T 细胞增殖反应的影响

与单纯 CD3/CD28'组比较,单纯 LPS'组 CD4⁺T 细胞增殖率明显降低 ($P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-4 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与单纯 LPS'组比较,LPS + 血必净'组、LPS + 芍药苷'组 CD4⁺T 细

胞增殖率均明显增加 ($P < 0.01$),细胞培养上清液中 IL-4 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 5 组大鼠 CD4⁺T 细胞增殖率及细胞培养上清液中 IL-4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | 增殖率 (%) | IL-4 (pg/mL) |
|-------------------------|-----|--------------|--------------|
| 空白对照'组 | 6 | 15.70 ± 2.68 | 33.9 ± 4.6 |
| 单纯 CD3/CD28'组 | 6 | 46.17 ± 0.29 | 30.6 ± 5.0 |
| 单纯 LPS'组 | 6 | 42.00 ± 0.35 | 38.9 ± 3.0 |
| LPS + 血必净'组 | 6 | 69.80 ± 4.16 | 35.9 ± 2.1 |
| LPS + 芍药苷'组 | 6 | 56.43 ± 3.06 | 35.0 ± 3.1 |
| <i>F</i> 值 | | 354.40 | 3.94 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | 0.013 |
| <i>t</i> ₁ 值 | | 22.47 | 3.51 |
| <i>P</i> ₁ 值 | | <0.001 | 0.006 |
| <i>t</i> ₂ 值 | | 16.31 | 2.05 |
| <i>P</i> ₂ 值 | | <0.001 | 0.068 |
| <i>t</i> ₃ 值 | | 11.48 | 2.19 |
| <i>P</i> ₃ 值 | | <0.001 | 0.053 |

注:IL-4 为白细胞介素 4,LPS 为内毒素/脂多糖;*F* 值、*P* 值为各指标组间总体比较所得;*t*₁ 值、*P*₁ 值为单纯 LPS'组与单纯 CD3/CD28'组各指标比较所得;*t*₂ 值、*P*₂ 值为 LPS + 血必净'组与单纯 LPS'组各指标比较所得;*t*₃ 值、*P*₃ 值为 LPS + 芍药苷'组与单纯 LPS'组各指标比较所得

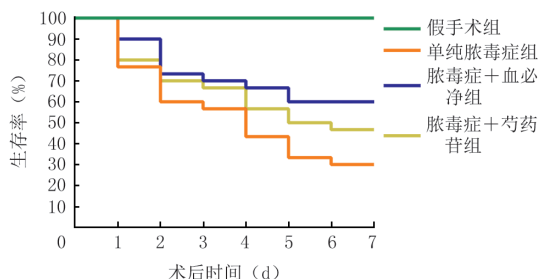
2.3 脓毒症大鼠生存率

假手术组、单纯脓毒症组、脓毒症 + 血必净组、脓毒症 + 芍药苷组大鼠术后 7 d 生存率分别为 100% (30/30)、30% (9/30)、57% (17/30)、47% (14/30)。脓毒症 + 血必净组大鼠术后 7 d 内生存率明显高于单纯脓毒症组 ($P < 0.05$),脓毒症 + 芍药苷组大鼠术后 7 d 内生存率与单纯脓毒症组相近 ($P > 0.05$)。见图 1。

表 1 5 组大鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫功能相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | CTLA-4 (%) | Foxp3 (MFI) | IL-10 (pg/mL) | 凋亡率 (%) |
|-------------------------|-----|------------|-------------|---------------|------------|
| 空白对照组 | 6 | 27.3 ± 1.2 | 518 ± 22 | 73 ± 6 | 77.9 ± 5.3 |
| 单纯 CD3/CD28 组 | 6 | 32.6 ± 3.3 | 753 ± 186 | 86 ± 9 | 63.1 ± 2.0 |
| 单纯 LPS 组 | 6 | 47.4 ± 1.4 | 1 109 ± 82 | 282 ± 11 | 64.6 ± 1.2 |
| LPS + 血必净组 | 6 | 28.8 ± 0.6 | 622 ± 70 | 151 ± 17 | 85.3 ± 2.2 |
| LPS + 芍药苷组 | 6 | 42.6 ± 1.5 | 914 ± 21 | 249 ± 16 | 73.1 ± 2.1 |
| <i>F</i> 值 | | 139.80 | 35.26 | 342.90 | 60.91 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| <i>t</i> ₁ 值 | | 27.19 | 17.00 | 40.76 | 6.02 |
| <i>P</i> ₁ 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| <i>t</i> ₂ 值 | | 31.03 | 11.27 | 15.49 | 20.32 |
| <i>P</i> ₂ 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| <i>t</i> ₃ 值 | | 5.79 | 5.64 | 4.20 | 8.60 |
| <i>P</i> ₃ 值 | | <0.001 | <0.001 | 0.002 | <0.001 |

注:Treg 为调节性 T 细胞,LPS 为内毒素/脂多糖,CTLA-4 为细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4,Foxp3 为叉头翼状螺旋转录因子 3,MFI 为平均荧光强度,IL-10 为白细胞介素 10;*F* 值、*P* 值为各指标组间总体比较所得;*t*₁ 值、*P*₁ 值为单纯 LPS 组与空白对照组各指标比较所得;*t*₂ 值、*P*₂ 值为 LPS + 血必净组与单纯 LPS 组各指标比较所得;*t*₃ 值、*P*₃ 值为 LPS + 芍药苷组与单纯 LPS 组各指标比较所得



注:4 组小鼠鼠数均为 30 只;脓毒症+血必净组大鼠术后 7 d 内生存率明显高于单纯脓毒症组 ($\chi^2 = 4.34$, $P = 0.037$),脓毒症+芍药苷组大鼠术后 7 d 内生存率与单纯脓毒症组相近 ($\chi^2 = 1.57$, $P = 0.211$)

图 1 假手术组与脓毒症 3 组大鼠 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨论

业已明确,脓毒症时 Treg 出现明显的凋亡抵抗及功能增强,进而抑制效应性 T 细胞活化及增殖^[11]。Huang 等^[12]观察到严重烧伤患者并发脓毒症后外周血 Treg 比例明显高于非脓毒症严重烧伤患者,且功能显著增强,且在死亡患者中差异更为明显,表明比例增加和功能增强的 Treg 可能是脓毒症所致免疫功能紊乱及患者高病死率的重要原因之一。本研究对 LPS 刺激下 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫功能进行了初步研究,结果显示 LPS 能显著上调 CD4⁺CD25⁺Treg 的 CTLA-4 及 Foxp3 表达及 IL-10 释放,提示在脓毒症状态下,除致病菌本身因素外其毒素产生亦是诱导免疫失衡的重要原因之一。许多资料证实,Treg 主要以接触抑制的方式发挥免疫抑制效应,CTLA-4 及 Foxp3 是 Treg 特征性标志及接触抑制的主要执行分子,其表达变化是 Treg 功能的直接反映^[11]。IL-10 是重要免疫负向调控分子,其释放增加与机体免疫抑制密切相关。本研究结果中的 LPS 能显著增加 CD4⁺CD25⁺Treg 中 IL-10 水平,表明 LPS 刺激可明显促进 CD4⁺CD25⁺Treg 功能活化并介导效应性 T 细胞抑制状态。因此,笔者进一步评估 CD4⁺CD25⁺Treg 对效应性 T 细胞增殖能力的影响,观察到 LPS 处理后 CD4⁺CD25⁺Treg 能显著诱导效应性 T 细胞增殖受限,并增加其抗炎性细胞因子 IL-4 的表达,初步明确 Treg 功能活化在 LPS 诱导 T 淋巴细胞免疫抑制中的重要作用及意义。此外,笔者通过分析 LPS 作用后 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡情况,证实 LPS 能有效地减少 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率,表明其比例增加可能是促使效应性 T 细胞功能抑制的重要原因之一。基于 Treg 免疫功能及数量调控的干预措施可能是改善脓毒症免疫应答障碍及

预后不良的潜在手段。

血必净是具有较强的抗炎、免疫调理及器官保护效应的中药注射剂,在急危重症特别是感染所致 MODS 救治中得到广泛应用。研究显示,在基础支持治疗的前提下,予以血必净能显著下调脓毒症患者炎症因子水平、降低 MODS 的发生率并有效提高伤后 28 d 生存率^[13]。本研究的体外实验中给予血必净处理显著逆转了 LPS 诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 功能亢进及凋亡抵抗,进而改善效应性 T 细胞的增殖情况。这与既往脓毒症动物模型研究结果相符,即血必净能明显提高脓毒症动物生存率,表明血必净的免疫调理效应在细胞及动物层面具有良好一致性^[14]。

中药制剂组分复杂多样且配比多元,其确切药理机制及临床安全性难以明确及预判,是目前其在临床推广应用的主要难题。李晴等^[15]对 296 200 例使用中药注射剂患者临床安全性集中监测进行系统评级得出,中药注射剂总体不良反应发生率较低 (1.58%),而血必净的不良不良反应发生率却达到 2.54%。这可能与血必净主要用于救治具有基础疾病的老年急危重症患者有关。因此,深入解析血必净的单体组分及其药代/药效特性对血必净的临床应用尤为重要。本研究选用了血必净中含量最高的芍药苷进行对比实验,证实芍药苷能显著逆转 LPS 介导 Treg 免疫亢进及凋亡减弱,并逆转其对效应性 T 细胞的增殖抑制。然而,芍药苷并未表现出优于血必净的作用,与之相反,其对 Treg 功能及凋亡的改善效应要明显弱于血必净,表明单一组分并不能替代血必净的综合免疫调节效应。

总之,Treg 免疫抑制活性增强及凋亡减弱是脓毒症免疫功能紊乱及预后不良的重要原因之一,及时有效调理 Treg 功能及数量可能成为脓毒症防治的重要途径之一。本组资料显示,血必净及其组分芍药苷均能逆转 LPS 介导 Treg 功能亢进及凋亡抵抗,并改善效应性 T 细胞增殖状态。然而,芍药苷对脓毒症时免疫调理及预后改善效应明显低于血必净。因此,进一步开展血必净有效组分筛选和单体成分组合优化研究,并研发组分明确及不良反应少的新一代血必净产品将有助于探寻脓毒症免疫调理新途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-

- 3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Rhodes A, Evans LE, 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. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255.
- [3] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13 (12): 862-874. DOI: 10.1038/nri3552.
- [4] 姚咏明. 关注调节性 T 细胞在脓毒症中的免疫学意义 [J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18 (2): 117-119. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2009.02.001.
- [5] Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients [J]. Intensive Care Med, 2009, 35 (4): 678-686. DOI: 10.1007/s00134-008-1337-8.
- [6] Liu QY, Yao YM, Yu Y, et al. Astragalus polysaccharides attenuate postburn sepsis via inhibiting negative immunoregulation of CD4⁺CD25⁺(high) T cells [J]. PLoS One, 2011, 6 (6): e19811. DOI: 10.1371/journal.pone.0019811.
- [7] 刘清泉, 梁腾霄, 刘红旭, 等. 血必净注射液治疗脓毒症的多中心临床研究 [J]. 北京中医, 2007, 26 (1): 15-18. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1307.2007.01.008.
- [8] Song YL, Yao C, Yao YM, et al. XueBiJing injection versus placebo for critically ill patients with severe community-acquired pneumonia: a randomized controlled trial [J]. Crit Care Med, 2019, 47 (9): e735-e743. DOI: 10.1097/CCM.00000000000003842.
- [9] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第七版) 的通知 [EB/OL]. 2020 (2020-03-03) [2020-04-30]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [10] 胡南, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药理学研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28 (9): 1093-1095. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2007.09.045.
- [11] 蒋丽娜, 姚咏明. 调节性 T 细胞在脓毒症免疫功能紊乱中的临床意义 [J]. 中华创伤杂志, 2010, 26 (9): 799-801. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2010.09.008.
- [12] Huang LF, Yao YM, Dong N, et al. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study [J]. Crit Care, 2010, 14 (1): R3. DOI: 10.1186/cc8232.
- [13] Li CY, Wang P, Zhang L, et al. Efficacy and safety of Xuebijing injection (a Chinese patent) for sepsis: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 224: 512-521. DOI: 10.1016/j.jep.2018.05.043.
- [14] 艾宇航, 姚咏明, 戴新贵. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对效应 T 细胞增殖和分泌功能的影响及血必净注射液的干预作用 [J]. 中华外科杂志, 2009, 47 (1): 58-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2009.01.020.
- [15] 李晴, 李蓓蓓, 郑文科, 等. 基于 296 200 例的中药注射剂临床安全性集中监测研究的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2019, 19 (1): 28-35. DOI: 10.7507/1672-2531.201809065.

(收稿日期:2020-04-30)

本文引用格式

姚人骐,任超,王丽雪,等. 血必净注射液及其组分芍药苷对脓毒症大鼠免疫功能和生存率的影响 [J]. 中华烧伤杂志, 2020, 36 (8): 658-664. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00246.

Yao RQ, Ren C, Wang LX, et al. Influence of Xuebijing injection and its component paeoniflorin on immune function and survival rate of septic rats [J]. Chin J Burns, 2020, 36 (8): 658-664. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00246.

· 科技快讯 ·**羟钴胺应用与烟雾吸入后急性肾损伤关系的多中心回顾性研究**

长期以来,羟钴胺一直被提倡用于治疗烟雾吸入后疑似氰化物中毒。然而,一项单中心研究证明静脉注射羟钴胺会导致草酸肾病。在多中心环境下,羟钴胺对烟雾吸入后急性肾损伤 (AKI) 风险和存活率的影响尚不清楚。作者对法国的 21 个 ICU 进行了多中心回顾性研究,纳入 2011 年 1 月—2017 年 12 月收治的因吸入烟雾收治入院的患者,排除了入院后 24 h 内存活出院的患者,采用 logistic 回归模型评估应用羟钴胺后 AKI、严重 AKI、主要不良肾脏事件 (MAKE) 和生存期的风险。结果显示,共筛查 854 例患者,纳入 739 例,其中 386 例 (55.2%) 接受了羟钴胺治疗。ICU 病死率为 32.9% (243/739); 288 例 (39%) 患者发生 AKI,其中 186 例 (25.2%) 在第 1 周发展为严重 AKI。接受羟钴胺治疗的患者病情更严重,病死率更高 ($P = 0.0022$)。静脉注射羟钴胺后罹患 AKI 和严重 AKI 的校正优势比分别为 1.597 (95% 置信区间 = 1.055 ~ 2.419) 和 1.772 (95% 置信区间 = 1.137 ~ 2.762); 静脉注射羟钴胺与生存率或 MAKE 无关,校正优势比分别为 1.114 (95% 置信区间 = 0.691 ~ 1.797) 和 0.784 (95% 置信区间 = 0.456 ~ 1.349)。由此,作者认为烟雾吸入后使用羟钴胺与 AKI 和严重 AKI 的风险增加有关,与存活率无关。

张均辉,编译自《Crit Care》,2019,23 (1): 421;江旭品,审校