

基础研究

肿瘤坏死因子- α 诱导的蛋白-8样分子2促进热损伤小鼠CD4⁺ T细胞凋亡黄 鹤^{1,2}, 田昭涛², 姚咏明³, 黎檀实¹¹解放军总医院急诊科, 北京 100853; ²济南军区总医院急诊重症中心, 山东 济南 250031; ³解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所基础部, 北京 100048

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子- α 诱导的蛋白-8样分子2(TIPE2)对重度烫伤小鼠模型脾脏CD4⁺T淋巴细胞的凋亡的影响。方法 140只成年雄性BALB/C小鼠分为6组,应用小RNA干扰技术制作siTIPE2/过表达慢病毒,复制小鼠重度烫伤模型。分离BALB/c小鼠脾脏CD4⁺T细胞,检测各组CD4⁺T淋巴细胞凋亡, Smad2/Smad3、磷酸(P)-Smad2/P-Smad3以及B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)家族蛋白Bcl-2/Bim的表达。检测各组小鼠CD4⁺T内线粒体膜电位改变情况及细胞色素C的变化和各组小鼠CD4⁺T内含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-3)、(caspase-8)、(caspase-9)的活化情况。结果 siTIPE2-burn组CD4⁺T淋巴细胞凋亡率为12.33%,较sham组外其余组减少, P-smad2/P-Smad3蛋白表达(灰度值)显著降低($P<0.01$)。siTIPE2-burn组Bcl-2的蛋白表达较其余组升高($P<0.05$), Bim的表达则降低($P<0.05$)。siTIPE2-burn组线粒体膜电位细胞色素C水平均较sham组外其余组降低($P<0.05$), caspase-3活性较TIPE2-burn组降低($P<0.01$), caspase-8、caspase-9活性较其余组降低($P<0.05$)。TIPE2-burn组凋亡率最高, TIPE2-burn组Smad2/Smad3蛋白表达较sham组明显升高($P<0.05$), P-smad2/P-Smad3蛋白表达较其余组显著升高($P<0.05$); CD4⁺T内线粒体膜电位较其余组降低($P<0.01$), 细胞色素C水平升高, caspase-3、caspase-8、caspase-9活性较其他组均升高($P<0.05$)。结论 TIPE2作为一种重要的负向调控分子,可通过促进转化生长因子 β 即TGF- β /Smads信号传导通路、线粒体相关凋亡途径加速T淋巴细胞凋亡。

关键词:肿瘤坏死因子 α ; 蛋白-8样分子2; 热损伤; 脓毒症; 免疫; 凋亡

Tumor necrosis factor- α -induced protein 8 like-2 promotes apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes in mice with severe burn injuryHUANG He^{1,2}, TIAN Zhaotao², YAO Yongming³, LI Tanshi¹¹Emergency Department, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Jinan Command, Jinan 250031, China; ³Trauma Research Center, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To investigate the effect of tumor necrosis factor- α -induced protein 8 like-2 (TIPE2) on apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes in a murine model of severe burn injury. **Methods** A total of 140 male mice were randomly allocated into 6 groups. Small RNA interference technique was used to construct a siTIPE2-overexpressing lentivirus, and severe burn injury models were established in the mice. CD4⁺ T cells were purified from spleen of the mice, and the expressions of TIPE2, Smad2/Smad3, P-Smad2/P-Smad3 and Bcl-2/Bim protein in CD4⁺ Tregs were detected. The changes in mitochondrial membrane potential and cytochrome C in CD4⁺ T cells were detected, and the activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 were analyzed. **Results** Down-regulation of TIPE2 promoted the apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes in siTIPE2-burn group, in which the protein expressions of P-smad2/P-Smad3 decreased, Bcl-2 expression increased and Bim expression decreased significantly as compared with the other groups ($P<0.01$ or 0.05). The mitochondrial membrane potential and cytochrome C expression in CD4⁺ T cells were down-regulated in siTIPE2-burn group ($P<0.05$) with a lowered caspase-3 activity compared with TIPE2-burn group ($P<0.01$) and decreased caspase-8 and caspase-9 compared with the other groups ($P<0.05$). The apoptosis rate was the highest in TIPE2-burn group, whose Smad2/Smad3 was higher than that in the sham group ($P<0.05$) and the expression of P-smad2/P-Smad3 significantly increased compared with the other groups ($P<0.05$). In TIPE2-burn group, the mitochondrial membrane potential in CD4⁺ T cells was decreased ($P<0.01$), the expression of cytochrome C increased markedly ($P<0.01$), and the activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 were all obviously higher than those in the other groups ($P<0.05$). **Conclusions** As an important immunoregulatory molecule, TIPE2 can promote the apoptosis of CD4⁺ T lymphocyte in mice with severe burn injury.

Key words: tumor necrosis factor- α ; protein 8 like-2; burn injury; sepsis; immunity; apoptosis

收稿日期:2016-05-19

基金项目:国家自然科学基金(81372054)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81372054).

作者简介:黄 鹤,主治医师,E-mail: huanghe_hh@126.com

通信作者:黎檀实,主任,E-mail: lts301@163.com

严重烧、创伤及外科大手术应激打击极易诱发脓毒症等感染并发症,进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),是临床烧、创伤和危重患者最主要

死亡原因之一。尽管临床治疗已取得显著进展,但病死率仍居高不下,成为直接影响患者预后、阻碍进一步提升危重烧伤救治成功率的突出难题,因此,提高对脓毒症的认识和防治水平无疑具有重要的理论价值及临床意义^[1]。

淋巴细胞凋亡在维持免疫稳态和自身免疫耐受中起着重要作用。在严重创伤打击时,无论是在中枢还是外周淋巴器官中均发现了大量淋巴细胞凋亡^[2]。淋巴细胞凋亡增加可能是机体免疫抑制发生的重要机制之一^[3-4]。Smad2和Smad3是转化生长因子 β 1(TGF β 1)下游受体激活蛋白,活化的TGF β 1使Smad2/Smad3发生磷酸化而被激活,受到Bcl-2家族的促凋亡和抗凋亡蛋白的调节,通过细胞色素C的释放激活胱天蛋白酶(caspase-9)。最终活化的caspase-8、caspase-9都通过激活下游的caspase-3介导细胞的凋亡。Bcl-2、Bcl-xl维护线粒体的完整性从而阻碍了细胞色素C的释放;Bax、Bim等促凋亡成员则促进了这一过程的发生。

肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白-8样分子2(TIPE2)是新近发现的蛋白,在体内试验中,敲除小鼠TIPE2基因两个月后发现部分动物出现慢性疾病,表现为体重减轻、脾肿大、白细胞增加和多器官自发性炎症反应,说明TIPE2缺乏容易诱发广泛性炎症^[5-6]。本课题组先前研究已证实TIPE2在烫伤小鼠T淋巴细胞存在表达,烫伤后24 h表达最高^[7-8],并且发现沉默TIPE2后烫伤小鼠中IFN- γ 显著升高而IL-4水平显著下降,IFN- γ /IL-4比值明显升高,说明脾脏TIPE2可能参与组织局部促炎和抗炎性细胞因子表达调节,并对局部免疫产生影响。我们假设TIPE2是介导严重烧伤后T淋巴细胞免疫功能障碍的关键调控分子,并很可能通过线粒体相关凋亡途径调节T淋巴细胞凋亡发挥作用。本研究通过研究TIPE2与CD4⁺T细胞凋亡之间的关系,探讨其参与严重烧伤后脓毒症的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验小鼠为健康清洁级BALB/C小鼠,购自中国医学科学院医学实验动物研究所,均为雄性,体质量 20 ± 2 g。140只成年雄性BALB/C小鼠分为6组:烫伤组(burn)40只,假伤组(Sham)40只,沉默TIPE2组(siTIPE2-burn)15只,沉默病毒对照组(siTIPE2-siTIPE2-negative-burn)15只,过表达TIPE2组(TIPE2-burn)15只,过表达病毒对照组(TIPE2-negative-burn)15只。

1.2 RNA干扰及过表达

TIPE2小RNA干扰慢病毒表达载体(siRNA)由上海吉凯公司合成,siRNATIPE2的DNA靶序列为5'-GAAGTGAACTCAGGTCCG-3'^[5],对照组RNA序

列5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。过表达DNA靶序列上游引物为GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGAGTCCTTCAGCTCA,下游引物为TCCTTGTAGTCCATACCGAGCTTGCCCTCGTCCAG。过表达对照组采用空载体质粒。合成DNA片段转移至pGCL-GFP构建pFIV-H1/U6-copGFP载体,转染过程严格按照说明书执行。

1.3 动物模型

小鼠适应性饲养1周,自由进食水,室温25℃,昼夜节律为12 h。术前禁食12 h,自由饮水。小鼠乙醚麻醉后,剃去背部鼠毛,暴露背部在99℃热水中烫8 s,根据公式计算小鼠体表面积,造成15%面积皮肤烫伤模型。假伤组小鼠除了浸泡温水,其他麻醉方式和喂养同烫伤组。后4组通过尾静脉分别注射携带siTIPE2/过表达或空载体对照慢过表达或空载体对照慢病毒,待2周后复制小鼠burn模型,术后予0.9%生理盐水40 mL/kg抗休克治疗,所有小鼠在烫伤24 h处死。动物实验相关方案通过动物伦理委员会批准,动物处置过程所有操作符合动物伦理学标准。

1.4 脾脏CD4⁺T细胞分离

小鼠断颈处死后无菌条件下取脾脏,分离小鼠脾脏单个核细胞。采用MiniMACS免疫磁性分离系统,每 10^8 个单核细胞加入100 μ L生物素-抗体“鸡尾酒”,4℃避光预冷10 min。然后加入300 μ L PBS,200 μ L抗生物素磁珠4℃避光预冷15 min后离心洗涤。500 μ L PBS重悬细胞,通过LS柱阴性分选后收集留出的细胞悬液,离心洗涤获得CD4⁺T细胞,分离出的CD4⁺T用FITC标记抗CD4抗体孵育,流式细胞术鉴定正常小鼠脾脏CD4⁺T细胞纯度(图1)。

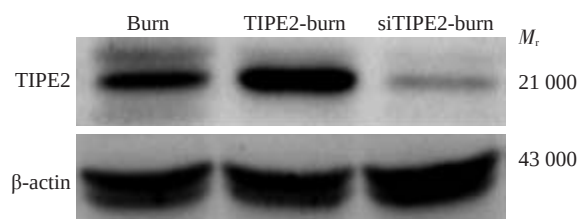


图1 Western blot检测burn组、TIPE2-burn组和siTIPE2-burn组TIPE2蛋白表达

Fig.1 Expressions of TIPE2 in burn, TIPE2-burn and siTIPE2-burn groups.

1.5 流式细胞术检测CD4⁺T细胞凋亡

根据PE Annexin-V凋亡试剂盒,离心收集细胞(5×10^5),用预冷的PBS洗2遍(1200 r/min离心8 min);加入100 μ L的稀释液1% Binding buffer重悬细胞,分别加入5 μ L Annexin V和7AAD混匀,4℃避光反应

20 min;加入 300 μ L 的稀释液 Binding buffer,1 h 内流式细胞仪检测。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blot)检测

检测各组小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞内 TIPE2, Smad2/Smad3、磷酸化(P)-Smad2/P-Smad3 以及 Bcl-2/Bim 的蛋白表达。采用 BCA 法对小鼠 CD4⁺T 细胞总蛋白进行定量分析。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中细胞蛋白上样量均为 50 μ g,取 30 μ L 浓缩物上样,用 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。第一抗体为兔抗鼠 TIPE2 多克隆抗体(1:500),兔抗鼠 Smad2 单克隆抗体(1:2000),兔抗鼠(P)-Smad2 多克隆抗体(1:500),兔抗鼠 Smad3 单克隆抗体(1:2000),兔抗鼠(P)-Smad3 单克隆抗体(1:2000),兔抗鼠 Bcl-2 单克隆抗体(1:1000),兔抗鼠 Bim 多克隆抗体(1:500),第二抗体为辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1:2500),单克隆 β -actin 作为蛋白对照,比较烫伤组和烫伤 RNAi-TIPE2 组 TIPE2 蛋白表达情况,观察 TIPE2 基因沉默效果。应用 ImageJ 软件分析目标条带的灰度值进行蛋白定量。

1.7 流式细胞仪检测 CD4⁺T 线粒体膜电位变化

按 JC-1 试剂盒说明书配制染色工作液。将各组细胞重悬于 0.5 mL 细胞培养液中,并加入 0.5 mL 的 JC-1 染色工作液,颠倒数次以混匀。于细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,600 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 3~4 min,沉淀细胞。弃上清,用 JCM 染色缓冲液洗涤 2 次后行流式细胞仪分析。

1.8 共聚焦荧光法检测 CD4⁺T 细胞色素 C 表达

收集 5×10^5 各组小鼠 CD4⁺T 细胞,PBS 润洗 3 次,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞。加入 4% 多聚甲醛溶液 500 μ L 室温下固定 30 min,PBS 洗涤去上清,加入 500 μ L 0.2% 的 TritonX-100 室温下穿孔 20 min。PBS 润洗细胞 2 次,1200 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 500 μ L 阻断缓冲液(1% BSA),室温下封闭 30 min。按 1:400 比例用 1% BSA 稀释细胞色素 C 抗体 500 μ L,4 $^{\circ}$ C 反应过夜。PBS 洗涤 1 遍,1:200 比例稀二抗 500 μ L 避光孵育 1 h,PBS 润洗细胞 2 次,弃上清。加入 200 μ L 的 DAPI 染色 30 min。载玻片滴 20 μ L 样本,加 1 滴 DAPI 混匀,加盖玻片,激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.9 化学比色法检测各组 CD4⁺T 内 caspase 活性

取收集 1×10^6 各组小鼠 CD4⁺T 细胞,PBS 洗涤 2 次,弃上清,加入 250 μ L 预冷的 Lysis buffer 混匀,冰浴 10 min 将样品细胞裂解,1000 g 离心 5 min,收上清转移至 EP 管中。检测取 96 孔培养板中进行,反应体系包括:100 μ g 蛋白(体积 50 μ L)、50 μ L 现配的反应液、5 μ L 的 caspase 比色底物,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h,Spectra MR 全功能酶标仪上检测 405 nm 处的吸光度值。实验设调零孔组 2 个,一组为不加蛋白样本组,另一组为不加比色底物组,剩余体积均由稀释液补足。各实验组设 2 个空

白孔。

1.10 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件,数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间样本比较采用方差分析,两两比较采用方差齐性检验,若方差齐性则使用 LSD 检验,方差不齐采用 Dennett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞纯度

从脾脏分离 CD4⁺T 细胞,通过流式细胞仪检测提取的正常小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞的纯度达到 92.9%。胎盘蓝染色活细胞率达到 98%。

2.2 CD4⁺T 细胞内 TIPE2 蛋白表达(图 2)

Western blot 检测结果显示, TIPE2 基因沉默使小鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞 TIPE2 表达下调 >70%; TIPE2-burn 组 TIPE2 蛋白表达使小鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞 TIPE2 表达上调 >50%。

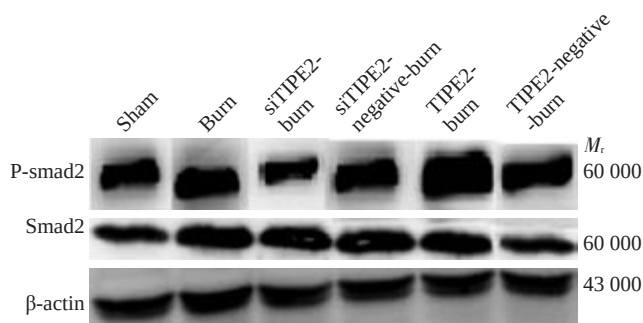


图2 CD4⁺T 内 Smad2 和 P-Smad2 蛋白表达

Fig.2 Expressions of Smad2/P-smad2 in CD4⁺T cells.

2.3 各组 CD4⁺T 细胞凋亡率比较

CD4⁺T 凋亡率 TIPE2-burn 组凋亡率最高(69.8%),而 siTIPE2-burn 组 CD4⁺T 凋亡率为 12.33%,与 Sham 组(10.82%)无统计学差异,但显著低于其余 5 组($P < 0.01$)。

2.4 CD4⁺T 内 Smad2/Smad3、P-Smad2/P-Smad3 和 Bcl-2/Bim 蛋白表达

从图 2、3 表 1、2 可以看出, burn 组 Smad2/Smad3 和 P-smad2/P-Smad3 较 sham 组和 siTIPE2-burn 组升高; siTIPE2-burn 组 Smad2/Smad3 无明显降低, P-smad2/P-Smad3 表达较其余组显著降低($P < 0.05$)。TIPE2-burn 组 Smad2/Smad3 较 sham 组明显升高($P < 0.05$),较其余组无统计学意义, P-smad2/P-Smad3 表达较其余组显著升高($P < 0.05$)。再结合图 4、表 3 可见, siTIPE2-burn 组 Bcl-2 的表达升高($P < 0.05$), Bim 的表达则降低($P < 0.05$)。TIPE2-burn 组反之。

2.5 CD4⁺T 线粒体膜电位变化

siTIPE2-burn 组线粒体膜电位为 $(97.50 \pm 2.40)\%$,

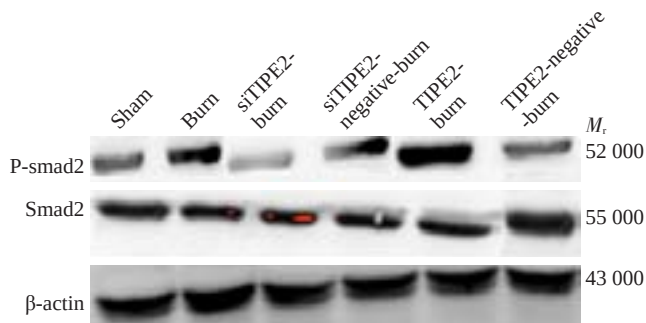


图3 Western blot检测CD4⁺T内 Smad3和P-Smad3 蛋白表达
Fig.3 Expressions of Smad3/P-Smad3 in CD4⁺T cells.

表1 各组小鼠脾脏 CD4⁺T内 Smad2/P-Smad2蛋白表达比较
Tab.1 Expressions of Smad2/P-Smad2 in CD4⁺ T lymphocytes (Mean±SD)

Group	Smad2	P-smad2
Sham	1.05±0.20	1.95±0.30
Burn	1.52±0.38*	2.13±0.12*
siTIPE2-burn	1.48±0.40	1.77±0.25 [#]
siTIPE2-negative-burn	1.53±0.26	2.15±0.46
TIPE2-burn	1.60±0.15 [#]	2.98±0.52 ^Δ
TIPE2-negative-burn	1.55±0.51	2.16±0.42

Smad2: * $P<0.05$ burn group *vs* sham and siTIPE2-burn groups. * $P<0.05$, TIPE2-burn group *vs* sham group. P-smad2: * $P<0.05$ burn group *vs* sham and siTIPE2-burn groups; * $P<0.05$, siTIPE2-burn group *vs* burn and TIPE2-burn groups; ^Δ $P<0.05$, TIPE2-burn *vs* other groups.

表2 各组小鼠脾脏 CD4⁺T内 Smad3/P-Smad3蛋白表达比较
Tab.2 Expressions of Smad3/P-Smad3 in CD4⁺ T lymphocytes (Mean±SD)

Group	Smad3	P-smad3
Sham	0.85±0.34	0.95±0.10
Burn	0.92±0.33*	1.10±0.05*
siTIPE2-burn	0.78±0.42	0.76±0.15 [#]
siTIPE2-negative-burn	0.93±0.56	1.08±0.16
TIPE2-burn	0.98±0.05 ^a	1.48±0.08 ^Δ
TIPE2-negative-burn	0.97±0.41	1.09±0.11

Smad3: * $P<0.05$ burn *vs* siTIPE2-burn group; [#] $P<0.05$, TIPE2-burn *vs* sham group. P-smad3: * $P<0.05$ burn *vs* sham and siTIPE2-burn groups; [#] $P<0.05$ siTIPE2-burn *vs* burn and TIPE2-burn groups; ^Δ $P<0.05$, TIPE2-burn *vs* other groups.

较 sham 组 (98.20 ± 1.20)% 外其余组比较升高 ($P<0.05$)。TIPE2-burn 组 CD4⁺T 内线粒体膜电位为 (70.90 ± 1.4)5%, 较其余组降低 ($P<0.01$)。

2.6 CD4⁺T 细胞色素 C 表达 (图 5)

siTIPE2-burn 组细胞色素 C 水平为 33.50 ± 3.40 %, 较除 sham 组 (23.20 ± 3.40)% 外降低, ($P<0.05$); TIPE2-

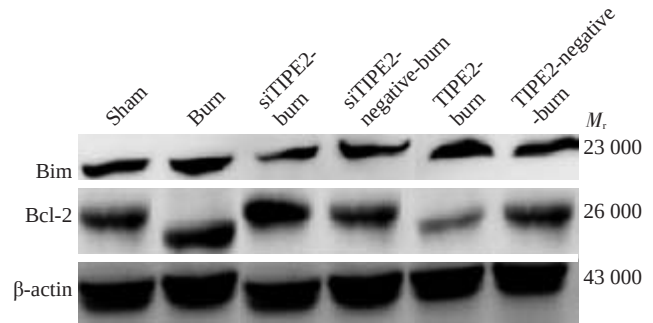


图4 各组小鼠脾脏 CD4⁺T内 Bcl-2/Bim 蛋白表达
Fig.4 Expressions of Bcl-2/Bim in CD4⁺T cells.

表3 各组小鼠脾脏 CD4⁺T内 Bcl-2/Bim 蛋白表达比较
Tab.3 Expressions of Bcl-2/Bim in CD4⁺ T lymphocytes (Mean±SD)

Group	Bcl-2	Bim
Sham	1.15±0.20	1.06±0.30
Burn	1.22±0.38	1.11±0.12
siTIPE2-burn	1.58±0.40*	0.87±0.25*
siTIPE2-negative-burn	1.23±0.26	1.15±0.46
TIPE2-burn	0.90±0.15 [#]	1.48±0.52 [#]
TIPE2-negative-burn	1.25±0.51	1.16±0.42

* $P<0.05$ siTIPE2-burn *vs* other groups; [#] $P<0.05$, TIPE2-burn *vs* other groups.

burn 组细胞色素 C 水平为 (51.90 ± 3.41)%, 较其余组有所升高 ($P<0.05$)。

2.7 化学比色法检测各组 CD4⁺T 内 caspase 活性

siTIPE2-burn 组 CD4⁺T 内 caspase-3 较 sham 组, burn 组, siTIPE2-negative-burn 组和 TIPE2-negative-burn 略降低, 但无统计学意义; 较 TIPE2-burn 组降低 ($P<0.01$), caspase-8、caspase-9 活性较其余组降低 ($P<0.05$)。TIPE2-burn 组 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性较其他组均升高 ($P<0.05$, 表 4)。

3 讨论

细胞免疫的状态被认为与脓毒血症的发生和发展密切相关。免疫细胞的凋亡是脓毒症介导免疫抑制的主要原因。动物研究证实脓毒症可以导致严重免疫细胞凋亡。大量动物和人研究证实脓毒症外周和脾脏淋巴细胞减少, 凋亡是淋巴细胞减少的主要的机制。防止 T 淋巴细胞凋亡可以增强宿主抵抗脓毒血症的能力。有研究发现抗凋亡免疫治疗可以改善其生存率。因此, T 淋巴细胞凋亡机制和凋亡预防是脓毒症新的研究及治疗靶点^[9-12]。降低脓毒症死亡率需要从预防免疫 T 细胞减少, 加速其功能恢复, 阻断免疫抑制通路的研究着手^[13-14]。业已明确, 脓毒症时调节 T 细胞通过膜结

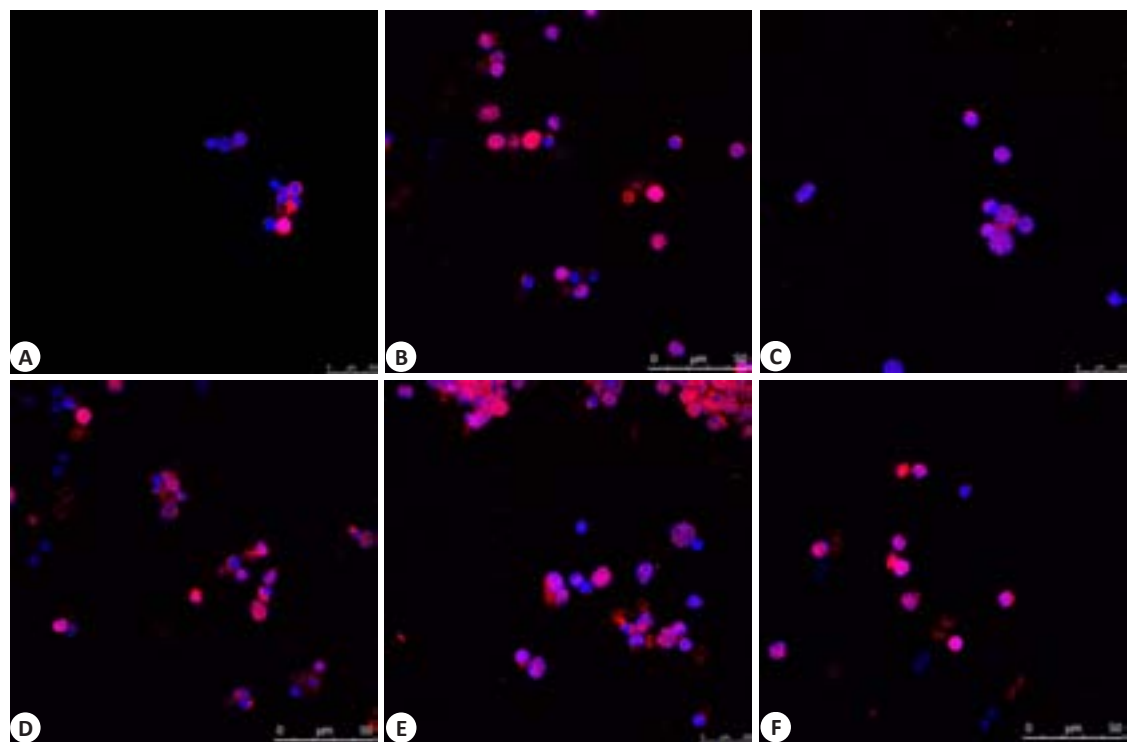


图5 各组CD4⁺ T细胞色素C表达
Fig.5 Changes in cytochrome C in CD4⁺T cells. The cytochrome C protein was directly labeled as red by the red pigment, and the DAPI was stained with blue. A: Sham; B: Burn; C: siTIPE2-burn; D: siTIPE2-negative-burn; E: TIPE2-burn; F: TIPE2-negative -burn.

表4 CD4⁺ T内caspase的活性变化比较
Tab.4 Caspase activity of T CD4⁺ cells in each group (Mean±SD)

Group	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
Sham	0.112±0.015	0.009±0.004	0.080±0.008
Burn	0.325±0.007	0.305±0.006	0.405±0.010
siTIPE2-burn	0.272±0.010*	0.122±0.005*	0.122±0.005*
siTIPE2-negative-burn	0.347±0.009	0.310±0.008	0.412±0.013
TIPE2-burn	0.560±0.012 ^{##}	0.485±0.014 [#]	0.604±0.016 [#]
TIPE2-negative-burn	0.330±0.009	0.309±0.010	0.410±0.020

Caspase3: *P<0.05 siTIPE2-burn vs TIPE2-burn group; Caspase8, Caspase9: *P<0.05 siTIPE2-burn vs other groups; [#]P<0.05, TIPE2-burn vs other groups.

合TGFβ1通路,参与了效应T细胞的凋亡^{〔15-16, 18〕}。其中线粒体通过释放凋亡基因在凋亡中起着关键性作用^{〔17, 19〕}。

2008年Sun等^{〔5〕}发现TIPE2以来,越来越多的证据证实TIPE2在维持免疫稳态中起着重要作用。主要通过Toll样受体信号通路和T细胞受体进行调节,另据报道小剂量内毒素攻击小鼠模型,与正常野生型组相比, TIPE2基因敲除组出现明显休克反应^{〔5〕}。研究说明TIPE2在急、慢性炎症病理过程中具有潜在调节效应^{〔5-6, 20〕}。有趣的是TIPE2在炎症组织中高表达,在正常组织少量表达或无表达^{〔21-22〕}。因此推测TIPE2是防止机体过度免疫反应和维持免疫稳态的重要调节器。TIPE2与

TNFAIP8家族其它成员有基因同源性,其被认为有调节凋亡的功能^{〔23-25〕}。有资料证实,内毒素刺激巨噬细胞TIPE2可下调多条炎症相关信号转导通路,减弱转录因子激活蛋白-1的活性。并且TIPE2基因缺陷细胞呈现对TLR和T细胞受体信号活化的高反应性^{〔5, 20, 26〕}。TIPE2参与机体免疫动态平衡调控过程的分子机制可能与其结合caspase-8有关。先前研究证实TIPE2蛋白存在于CD4⁺T细胞的胞浆中,沉默TIPE2基因表达后,小鼠脾T淋巴细胞增殖反应明显增强,凋亡减少,提示TIPE2的表达可促进T淋巴细胞的凋亡^{〔7-8〕},我们推测TIPE2参与了TGF-β1信号通路介导CD4⁺T细胞凋亡过

程。本研究旨在探讨通过体内实验 siRNA 沉默 TIPE2 表达下调对急性损伤后 CD4⁺T 细胞介导的凋亡的影响。

本研究发现, burn 组 Smad2/Smad3 磷酸化明显增强, TIPE2 基因沉默能够抑制 Smad2/Smad3 的活化。结果提示沉默 TIPE2 基因表达后, 降低了小鼠脾 T 淋巴细胞 TGFβ1 下游信号分子 Smad2/Smad3 活化, 从而降低 CD4⁺T 内促凋亡蛋白 Bim 表达, 促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 从而降低了小鼠脾 T 淋巴细胞的凋亡。反推 TIPE2 可以减少脓毒症 Bcl-2 蛋白表达, 增加 Bim 蛋白表达, 提示 TIPE2 作为一种重要的负向调控分子, 具有促进正常及烧伤后脓毒症小鼠脾 CD4⁺T 淋巴细胞凋亡的作用, 机制可能通过活化的 TGFβ1 使 Smad2/Smad3 发生磷酸化而被激活, 受到 Bcl-2 家族的促凋亡和抗凋亡蛋白的调节, 通过细胞色素 C 的释放 caspase-9。最终活化的 caspase-8、caspase-9 都通过激活下游的 caspase-3 介导 T 细胞的凋亡。

总之, TIPE2 作为一种重要的负向调控分子与机体细胞免疫功能异常密切相关, 很可能是体内关键的细胞免疫调节因子之一, 其确切作用及关键环节值得深入探讨。本研究证实 TIPE2 促进严重烧伤后脾脏 T 淋巴细胞的凋亡, 这对于从新的角度深入认识 TIPE2 在烧伤脓毒症发病中的地位具有重要理论意义和临床价值, 并通过小 RNA 干扰技术可对 TIPE2 表达进行干预, 为脓毒症免疫机制和诊治研究提供新方向。今后仍需进一步扩大样本量, 对其结论进行充分验证。

参考文献:

- [1] Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007) [J]. *Chest*, 2011, 140(5): 1223-31.
- [2] Zhang QH, Chen Q, Kang JR, et al. Treatment with gelsolin reduces brain inflammation and apoptotic signaling in mice following thermal injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 118.
- [3] Russell JA. Management of sepsis [J]. *Engl J Med*, 2006, 355: 1699-713.
- [4] Jiang LN, Yao YM, Sheng ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2012, 32(8): 341-9.
- [5] Sun HH, Gong SY, Carmody RJ, et al. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis[J]. *Cell*, 2008, 133(3): 415-26.
- [6] Li D, Song L, Fan Y, et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Immunol*, 2009, 133(3): 422-7.
- [7] Luan YY, Yao YM, Zhang L, et al. Expression of tumor necrosis factor-α induced protein 8 like-2 contributes to the immunosuppressive property of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice[J]. *Mol Immunol*, 2011, 49(1/2): 219-26.
- [8] Jiang LN, Yao YM, Zhu XM, et al. The effect of tumor necrosis factor-α-induced protein 8 like-2 on immune response of CD4⁺ T lymphocytes in mice after thermal injury[J]. *Eur Inflamm*, 2013, 11(1): 83-98.
- [9] Wesche D, Lomas-Neira J, Perl M, et al. Ayala A: leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock[J]. *Leukoc Biol*, 2005, 78(2): 325-37.
- [10] Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, et al. Negative signaling contributes to T-cell anergy in traumapatients [J]. *Crit Care Med Crit Care Med*, 2007, 35(3): 794-801.
- [11] Chang K, Unsinger J, Davis C, et al. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis [J]. *FASEB*, 2007, 21(3): 708-19.
- [12] Kasten K, Tschöp J, Adediran S, et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis [J]. *Shock*, 2010, 34(4): 327-36.
- [13] Cabrera-Perez J, Condotta S, Badovinac V, et al. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity[J]. *Leukoc Biol*, 2014, 96(5): 767-77.
- [14] Kim JS, Kim SJ, Lee SM. Genipin attenuates sepsis-induced immunosuppression through inhibition of T lymphocyte apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27(1): 15-23.
- [15] 尹承芬, 秦庆华, 董宁, 等. 调节性 T 细胞通过膜结合转化生长因子β1 影响效应性 T 细胞凋亡 [J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2013, 8(3): 215-9.
- [16] Luan YY, Yin CF, Qin QH, et al. Effect of regulatory T cells on promoting apoptosis of T lymphocyte and its regulatory mechanism in sepsis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(12): 969-80.
- [17] Ten Dijke P, Hill C. New insights into TGF-β-Smad signaling[J]. *Trends Biochem*, 2004, 29(5): 265-73.
- [18] 秦庆华. 调节性 T 细胞促进效应 T 细胞凋亡在脓毒症免疫抑制中的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学. 2013: 1-3.
- [19] Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4): 632-40.
- [20] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis[J]. *Cell*, 2008, 133(3): 401-2.
- [21] Zhang GZ, Hao CY, Lou YW, et al. Tissue-specific expression of TIPE2 provides insights into its function[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(15): 2435-42.
- [22] Kumar D, Gokhale P, Broustas C, et al. Expression of SCC-S2, an antiapoptotic molecule, correlates with enhanced proliferation and tumorigenicity of MDA-MB 435 cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 612-6.
- [23] Zhang CB, Chakravarty D, Sakabe I, et al. Role of SCC-S2 in experimental metastasis and modulation of VEGFR-2, MMP-1, and MMP-9 expression[J]. *Mol Ther*, 2006, 13(5): 947-55.
- [24] Woodward MJ, De Boer J, Heidorn S, et al. Tnfrp8 is an essential gene for the regulation of glucocorticoid-mediated apoptosis of thymocytes[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(2): 316-23.
- [25] Zhang X, Wang JW, Fan C, et al. Crystal structure of TIPE2 provides insights into immune homeostasis[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(1): 89-90.

(编辑: 吴锦雅)