

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.17.005

## 大鼠热应激对细胞免疫学的影响

周文芸, 吕芷娴, 曾黎峰, 何 丹, 胡国柱<sup>△</sup>

(江西省人民医院临床医学研究所, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨热应激对大鼠脾脏细胞 Toll 样受体 4(TLR4)及外周血 T 调节(Treg)细胞表达的影响。**方法** 将 72 只 SD 大鼠分为 20 ℃ 常温组和 37 ℃ 高温湿热组, 每组分非刺激、细菌脂多糖(LPS)刺激、刀豆素-A(Con-A)刺激亚组, 每个亚组设 1、12、48、168 h 观察点; 流式细胞术测定 TLR4<sup>+</sup> 细胞及 Treg 细胞。**结果** 37 ℃ 高温湿热组脾脏 TLR4<sup>+</sup> 细胞比率在各亚组的 1~168 h 均低于 20 ℃ 常温组( $P < 0.05$ )。37 ℃ 高温湿热组各亚组 1~48 h 的外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 较 20 ℃ 常温组显著下降( $P < 0.05$ ), 只有 LPS 刺激的 168 h 稍有升高, 37 ℃ 高温湿热组中非刺激及 Con-A 刺激亚组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 在 12 h 时间点较 20 ℃ 常温组显著升高, 而在 168 h 时间点各亚组显著降低( $P < 0.05$ )。37 ℃ 高温湿热组中各亚组 1 h 和 168 h 的外周血 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 较 20 ℃ 常温组显著升高; 而 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 各亚组在 1 h 和 48 h 较 20 ℃ 常温组显著降低, 在非刺激和 LPS 刺激亚组的 12 h 和 168 h 较 20 ℃ 常温组显著升高( $P < 0.05$ )。**结论** 高温湿热可破坏大鼠固有免疫并改变适应性免疫的功能状态。

**[关键词]** SD 大鼠; 脾脏; 免疫细胞; TLR4; Treg; 热应激; LPS; Con-A

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2270-05

### The effect of heat stress on cell immunology in rats

ZHOU Wenyun, LV Zhixian, ZENG Lifeng, HE Dan, HU Guozhu<sup>△</sup>

(Institution of Clinical Medicine, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of heat stress on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and peripheral blood T regulatory cells (Treg) in splenic cells of rats. **Methods** Seventy-two SD rats were divided into 20 ℃ control group and 37 ℃ group. Each group was divided into non stimulation, bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulation and concanavalin A (Con-A) stimulation subgroup. Each subgroup had 1, 12, 48 h and 168 h observation points, and flow cytometry was used to determine the level of TLR4 and Treg. **Results** The TLR4<sup>+</sup> immunocompetent cells in the spleen was decreased from 1 h to 168 h in every subgroup of the 37 ℃ group compared to the 20 ℃ control group ( $P < 0.05$ ). The level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg in the peripheral blood in rats from 1 to 48 h was significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and slightly increased at 168 h in LPS stimulation subgroup in the 37 ℃ group compared to the 20 ℃ control group. The level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg in the peripheral blood in rats at 12 h were significantly increased in non-stimulation and concanavalin A (Con-A) stimulation subgroups in the 37 ℃ group, and were significantly decreased at 168 h in every subgroup of the 37 ℃ group compared with 20 ℃ control group ( $P < 0.05$ ). The level of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg in the peripheral blood in rats was significantly increased at 1 h and 168 h in the 37 ℃ hot and humid group in the every subgroup when compared with the 20 ℃ control group ( $P < 0.05$ ). The level of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg in the peripheral blood in rats was significantly decreased at 1 h and 48 h in the every subgroup, and was significantly increased at 12 h and 168 h in the non-stimulation and LPS stimulation subgroups in the 37 ℃ group compared to the 20 ℃ control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High temperature and damp heat can destroy the innate immunity and alter the functional state of adaptive immunity in rats.

**[Key words]** rats, sprague-dawley; spleen; immunocompetent cells; Toll-Like receptor 4; Treg; heat stress; lipopolysaccharides; Con-A

热应激是指在高温环境中的机体对过热刺激所缺氧等; 细胞氧化代谢及过氧化物产生增加; 水和电产生的非特异性生理反应, 其中包括呼吸、心率加快、解质平衡紊乱。然而热应激最初反应是神经内分泌

紊乱,交感神经系统及脑垂体-丘脑下部-肾上腺系统功能亢进,免疫受到抑制。狗热应激 42.3 °C 90 min,外周血淋巴细胞持续 8 d 减少,有丝分裂原刺激 T 细胞增殖也被抑制<sup>[1]</sup>。热应激的孕牛其产下的小牛 4 周内 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)表达下降,淋巴细胞数量减少<sup>[2]</sup>。大鼠热应激肠系膜淋巴结 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞减少,而 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞增加<sup>[3]</sup>。20~40 岁的男性志愿者热应激,其血浆去甲肾上腺素/肾上腺素、去甲肾上腺素/皮质醇,以及白细胞介素 4/II 型干扰素(IL-4/IFN-γ)的比值升高,证明交感神经系统参与免疫抑制调节,同时免疫调节向辅助 T 细胞(Th2)方向发展<sup>[4]</sup>。动物慢性热应激增加了 H5N1 流感病毒感染的易感性,抑制了 Th1 和 Th2 免疫反应,降低了 H5N1 流感病毒疫苗免疫接种后的保护作用,其原因是慢性热应激诱导动物 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T(Treg)细胞产生,IL-10 和 TGF-β 产生增加<sup>[5]</sup>。少突细胞髓鞘糖蛋白[MOG(35-55)]肽接种小鼠 2 d 开始热应激,结果实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的发生率减少了 70%,且延迟发病,症状减轻,白细胞浸润减少,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞减少,MOG(35-55)活化的 T 细胞也下降<sup>[6]</sup>。

TLR4 是识别细菌脂多糖(LPS)、一些病毒及原虫等病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的识别受体(pattern recognition receptors, PRR),主要表达于单核/巨噬细胞、树突状细胞、粒细胞及自然杀伤(NK)细胞,TLR4 在脾和外周血白细胞表达最强。TLR4 与 PAMPs 结合起到清除病原微生物的天然免疫<sup>[7]</sup>和特异性免疫作用<sup>[8]</sup>。

TLR4 具有天然免疫和特异性免疫双重作用。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg 和 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg 均为 Treg 细胞<sup>[9]</sup>。因此,本文观察热应激大鼠脾脏细胞 TLR4 表达及外周血两种 Treg 细胞的变化,以期为高温高湿所致疾病的预防提供理论基础,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** SPF 级 SD 大鼠(上海市西普尔-必凯实验动物有限公司)72 只,雄性,体质量(267.26±31.08)g,鼠龄 9~15 周。LPS 和刀豆素 A(Con-A, Sigma 公司);抗 PE-TLR4(Abcam 公司)及抗 PE-IgG2b k(eBioscience 公司);抗 PE-Cy5-CD4(BD Pharmingen 公司)及抗 PE-Cy5-IgG2a k(eBioscience 公司);抗 PE-CD25 及抗 PE-IgG1,抗 FITC-Foxp3 及抗 FITC-IgG2a,抗 FITC-CD8b 及抗 FITC-IgG1,抗 PE-Cy5-Foxp3 及抗 PE-Cy5-IgG2a;Foxp3 Fixation/Permeabilization 及 Permeabilization 缓冲液(eBioscience 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组** (1)正常对照组(20 °C 组)36 只大鼠分

为非刺激组、LPS 刺激组(腹腔注射 LPS,1.0 mg/kg),Con-A 刺激组(腹腔注射 Con-A,5.0 mg/kg),每组 12 只,自然环境饲养,自由进食进水,湿度 50%;(2)高温湿热组(37 °C 组)组 36 只大鼠分为非刺激组、LPS 刺激组、Con-A 刺激组,每组 12 只,37 °C 培养箱中饲养,自由进食进水,饱和湿度(100%);每组观察时间点为处理后 1、12、48、168 h 时间点(3 只大鼠/时间点)。

**1.2.2 脾脏单个核细胞悬液制备** 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,取脾脏用含 1.0%小牛血清(FCS)+0.03% NaN<sub>3</sub> 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)经 200 目不锈钢网研磨制成细胞悬液,离心洗涤 2 次,调整细胞浓度为 1×10<sup>7</sup> 个/mL。

**1.2.3 脾脏 TLR4<sup>+</sup>测定** 采用流式细胞术方法:10.0 μL TLR4-PE 抗体(1.0 μg)加至塑料试管底,再加同型对照抗体 5.0 μL 于另一管,然后每管加 5×10<sup>8</sup> 个/L 脾脏细胞混匀,室温孵育 40 min;再加 90.0 μL 红细胞裂解液孵育 10 min;最后加 2.0 mL PBS 400×g 离心力离心 5 min,洗涤 2 次。加 0.4 mL 流式细胞仪鞘液混匀后进行流式细胞仪检测。

**1.2.4 Treg 细胞检测** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞,CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞及 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 测定采用流式细胞术方法,具体步骤见参考文献[10]。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高温湿热影响大鼠脾脏 TLR4<sup>+</sup>细胞的数量** 37 °C 高温湿热导致大鼠脾脏 TLR4<sup>+</sup>细胞数量下降( $P < 0.05$ ),即使 LPS 和 Con-A 刺激大鼠也无法逆转这种免疫抑制状态,提示高温湿热可破坏机体天然免疫功能,见表 1~3。

表 1 非刺激亚组不同时间点 TLR4<sup>+</sup>细胞比较( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	33.00±8.31	12.05±3.71	46.13±10.88	13.10±1.64
37 °C	13.30±9.18 <sup>a</sup>	2.94±0.80 <sup>ab</sup>	1.62±0.27 <sup>ab</sup>	1.99±1.77 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与同时间点 20 °C 比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$  与同组 1 h 比较

表 2 LPS 刺激亚组不同时间点 TLR4<sup>+</sup>细胞比较( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	32.23±5.87	17.50±9.44	33.17±14.12	10.92±2.06
37 °C	13.18±5.08 <sup>a</sup>	1.10±0.85 <sup>ab</sup>	0.87±0.39 <sup>ab</sup>	1.79±0.70 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与同时间点 20 °C 比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与同组 1 h 比较

**2.2 高温湿热影响大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞表达** 37 °C 高温湿热各亚组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Treg 细胞在 1~48 h 较 20 °C 显著下降 ( $P < 0.05$ ), 只有 LPS 刺激 168 h 则较 20 °C 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 4~6。

表 3 Con-A 刺激亚组不同时间点 TLR4<sup>+</sup> 细胞比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	48.13 ± 16.54	15.02 ± 5.60	38.60 ± 3.80	13.33 ± 2.42
37 °C	10.17 ± 6.35 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.31 <sup>ab</sup>	2.49 ± 0.81 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.72 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h 比较

表 4 非刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	5.99 ± 0.32	4.04 ± 0.32	6.80 ± 5.42	3.37 ± 0.57
37 °C	1.62 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.37 <sup>a</sup>	4.78 ± 0.32 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 12 h, 48 h 比较

表 5 LPS 刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	4.58 ± 0.11	3.44 ± 0.63	6.67 ± 1.92	2.99 ± 1.46
37 °C	1.66 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.92 ± 1.75 <sup>a</sup>	3.49 ± 1.05 <sup>ab</sup>	6.52 ± 0.39 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 12 h 比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 12 h, 48 h 比较

表 6 Con-A 刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	4.61 ± 1.53	3.95 ± 1.84	7.47 ± 4.11	5.49 ± 1.17
37 °C	1.35 ± 0.47 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.95 ± 1.09 <sup>a</sup>	6.97 ± 2.77 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 12 h, 48 h 比较

**2.3 高温湿热影响大鼠外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞表达** 37 °C 高温湿热各亚组外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞所占 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的百分率在 12 h 高于 20 °C 组 ( $P < 0.05$ ), 而 168 h 则显著低于 20 °C 组 ( $P < 0.05$ ), LPS 刺激使 12 h 相对降低。168 h 长期高温湿热导致外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞显著减少, 可能改变机体的免疫状态, 见表 7~9。

表 7 非刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	14.84 ± 6.61	16.35 ± 4.57	39.60 ± 24.90	33.79 ± 4.43
37 °C	15.15 ± 6.35	67.63 ± 5.17 <sup>ab</sup>	36.23 ± 6.56 <sup>c</sup>	10.99 ± 1.26 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 48 h, 168 h 比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h 比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12 h, 48 h 比较

**2.4 高温影响大鼠外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞表达** 37 °C 高温湿热各亚组在 1 h 和 168 h 外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞较 20 °C 升高 ( $P < 0.05$ ), LPS 和 Con-A 刺激也未明显改变这种规律, 见表 10~12。

表 8 LPS 刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	17.18 ± 9.71	14.46 ± 6.83	44.67 ± 1.84	30.80 ± 8.82
37 °C	13.70 ± 1.89	19.56 ± 23.57	37.14 ± 11.95 <sup>b</sup>	5.73 ± 3.35 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 168 h 比较

表 9 Con-A 刺激亚组不同时间点外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	17.67 ± 3.14	28.68 ± 5.31	52.60 ± 20.61	23.04 ± 13.40
37 °C	16.26 ± 7.01 <sup>b</sup>	52.80 ± 12.48 <sup>a</sup>	44.86 ± 11.59	4.54 ± 2.32 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12 h, 48 h 比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12 h, 48 h 比较

表 10 非刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞均数间的比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	0.81 ± 0.11	0.91 ± 0.06	2.24 ± 1.08	0.44 ± 0.12
37 °C	6.12 ± 0.39 <sup>ab</sup>	1.11 ± 0.36	0.15 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.22 ± 3.05 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12, 48 h 比较

表 11 LPS 刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	0.51 ± 0.10	1.22 ± 1.17	0.96 ± 0.29	0.55 ± 0.08
37 °C	8.83 ± 2.97 <sup>ab</sup>	1.41 ± 0.16	0.58 ± 0.35	3.04 ± 0.32 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12 h, 48 h 比较

表 12 Con-A 刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞均数间的比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	0.52 ± 0.17	2.17 ± 1.94	0.84 ± 0.22	0.57 ± 0.06
37 °C	7.24 ± 2.68 <sup>ab</sup>	1.29 ± 0.34	0.26 ± 0.026	3.39 ± 1.33 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 12 h, 48 h 比较

表 13 非刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	14.13 ± 1.80	5.56 ± 2.26	30.25 ± 27.15	0.00 ± 0.00
37 °C	1.43 ± 0.46 <sup>a</sup>	17.06 ± 7.54 <sup>ab</sup>	1.78 ± 1.88 <sup>a</sup>	1.83 ± 1.04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 48 h, 168 h 比较

**2.5 高温湿热影响大鼠外周血 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞表达** 37 °C 高温湿热非刺激和 LPS 刺激亚组在 12 h 和 168 h 外周血 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞较 20 °C 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 Con-A 刺激亚组在 37 °C 168 h 则恢复正常, 见表 13~15。

表 14 LPS 刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	16.09 ± 3.02	5.84 ± 5.31	15.99 ± 14.23	0.59 ± 0.26
37 °C	1.13 ± 0.14 <sup>a</sup>	16.91 ± 7.66 <sup>ab</sup>	2.11 ± 2.29 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.89 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 48 h, 168 h 比较

表 15 Con-A 刺激亚组不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞均数间的比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

温度	1 h	12 h	48 h	168 h
20 °C	19.46 ± 2.23	9.56 ± 4.24	25.20 ± 13.96	1.16 ± 0.33
37 °C	1.31 ± 0.12 <sup>a</sup>	15.72 ± 6.52 <sup>b</sup>	9.19 ± 8.11 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.22

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时间点 20 °C 比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 h, 168 h 比较

### 3 讨 论

TLR4 存在于髓系非特异性免疫活性细胞上参与固有免疫和获得性免疫反应<sup>[8]</sup>, 因此免疫活性细胞 TLR4 表达下降不但导致非特异性免疫功能下降, 同时也降低了特异性免疫反应。TLR4 的刺激剂 LPS 能够刺激 DCs 表达 TLR4 增加, 促进 DCs 上的 TLR4 对病原和异物进行内吞<sup>[11]</sup>。小鼠静脉注射 LPS 1~5 h 后脾组织 TLR4、CD14 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达逐渐增加<sup>[12]</sup>。本研究证明大鼠在 37 °C 饱和湿度(100% 湿度)热应激时脾脏 TLR4<sup>+</sup> 免疫活性细胞数量在 1~168 h 均显著降低, TLR4 的激动剂 LPS 也未能在 1~12 h 促进脾脏免疫活性细胞表达 TLR4 增加, 在 48~168 h 也未能恢复, 而 T 淋巴细胞有丝分裂原 Con-A 刺激更不能改变 TLR4 表达被抑制的状态, 见表 1~3。

热应激引起交感神经系统(去甲肾上腺素)和下丘脑-垂体-肾上腺系统(肾上腺素)的亢进, 然而肾上腺素能促进 LPS 刺激的巨噬细胞吞噬指数增加、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌, 以及 CD14 表达<sup>[13]</sup>, 也有报道证明肾上腺素抑制 LPS 诱导的单核细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-8、MCP-1 的产生, 以及 CD11b 的表达<sup>[14]</sup>。本研究发现非刺激组及 48~168 h 的 LPS 亚组即使肾上腺素应激激素下降后脾脏免疫细胞 TLR4 表达率仍显著下降, 说明高温高湿环境下大鼠天然免疫受抑制可能是多因素共同作用的结果。

去甲肾上腺素升高经  $\beta_2$  肾上腺能受体导致人和小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖降低、CD8<sup>+</sup> 细胞减少 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  表达, 出现免疫力降低<sup>[15-16]</sup>。CD4<sup>+</sup>

CD25<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞只有表达 Foxp3 后获得抑制功能<sup>[17]</sup>, 而单纯 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞仅仅是辅助和抑制或杀伤功能细胞。本研究发现大鼠热应激 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞表现不尽相同, 大鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞在 37 °C 饱和湿度(100%)热应激 1~48 h 显著下降, 增殖受到明显抑制, 即使 T 淋巴细胞刺激剂 Con-A 刺激也不能改变抑制状态, 更不用说 LPS 无关刺激; 而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在 1~48 h 之内并不降低, 其中 12 h 时间点在非刺激和 Con-A 刺激组仍显著升高, 这种现象反映热应激早期(1~48 h)机体出现相对免疫抑制状态, 将促进感染性疾病的发生; 但是长期高温湿热应激(168 h), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞在非刺激和 Con-A 刺激组恢复正常, LPS 组甚至显著高于正常对照(20 °C), 事实上 LPS 能够刺激 DC 促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖<sup>[18]</sup>; 而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在 168 h 则较正常对照组显著下降, 这可能与热应激激素下降有关, 也许长期高温湿热容易导致免疫抑制减弱。

本研究还发现大鼠热 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞在 37 °C 饱和湿度(100%)热应激在非刺激、LPS 刺激及 Con-A 刺激组 1 h 均显著高于 20 °C 组, 慢慢下降直到 48 h 达最低, 168 h 又显著升高, 可能热应激导致应激激素增加后出现机体炎性反应和细胞毒性作用, 然后随着机体免疫相对处于抑制状态(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞相对增加), 其 CD8<sup>+</sup>增殖和活化受到抑制, 但长期(168 h)高温湿热(100%)又显著升高, 可能与同期 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞降低, 免疫抑制减弱相关, Con-A 和 LPS 刺激也对 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞无改变; 而 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的表现与 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞不一致, 其在 1 h 和 48 h 显著降低, 12 h 显著升高, 这可能与热应激激素作用相关, 也进一步证明 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞被作用后 12~48 h 显著降低, 但长期(168 h)高温湿热(100%)CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在非刺激和 LPS 刺激组又显著升高, 其与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的下降产生互补, 避免了免疫过强或变态反应发生, 然而 T 细胞有丝分裂原 Con-A 刺激组则在长期高温湿热中 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞并不增加, 也许代表着 T 细胞在长期高温湿热中被抗原刺激容易导致免疫抑制减弱而出现免疫过强或变态反应发生。HENEKA 等<sup>[6]</sup>证明, MOG(35-55)免疫接种小鼠 2 d 后开始热应激, 结果实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的发病率减少了 70%, 且延迟发病, 并发病减轻, 白细胞浸润减少, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞减少, MOG(35-55)活化的 T 细胞也下降。

高温湿热应激机体 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg

细胞及 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞的表现不相同,因为这两大类细胞群体结构不同,功能作用方面也有差别,例如病毒感染高负荷时 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞也高,而 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞则在病毒高峰后数天才出现<sup>[19]</sup>;与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞不同的是 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞主要通过接触抑制<sup>[20]</sup>。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞,以及 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞的表现也不相同,其原因是 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞和 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞并不与抑制免疫反应相关,他们是正常活化的辅助和杀伤及细胞毒功能细胞,而 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞和 CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞才是抑制性 Treg 细胞。总之,在高温湿热应激中机体的免疫功能在早期有炎性因子产生和细胞杀伤导致炎性反应,而长时间持续高温湿热应激免疫抑制功能增强。

## 参考文献

- [1] OGLESBEE M J, DIEHL K, CRAWFORD E, et al. Whole body hyperthermia: effects upon canine immune and hemostatic functions[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 69(2/4):185-199.
- [2] STRONG R A, SILVA E B, CHENG H W, et al. Acute brief heat stress in late gestation alters neonatal calf innate immune functions[J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(11): 7771-7783.
- [3] LIU X, LI H, LU A, et al. Reduction of intestinal mucosal immune function in heat-stressed rats and bacterial translocation[J]. *Int J Hyperthermia*, 2012, 28(8):756-765.
- [4] SHAHABI S, HASSAN Z M, MAHDAVI M, et al. Hot and cold natures and some parameters of neuroendocrine and immune systems in traditional Iranian medicine: a preliminary study[J]. *J Altern Complement Med*, 2008, 4(2):147-156.
- [5] MENG D, HU Y, XIAO C, et al. Chronic heat stress inhibits immune responses to H5N1 vaccination through regulating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(1):160859.
- [6] HENEKA M T, SHARP A, MURPHY P, et al. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice[J]. *J Neurochem*, 2001, 77(2):568-579.
- [7] ROMANO C C, MAZZOLA N, PAOLILLO R, et al. Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to Chlamydia pneumoniae in mononuclear cells[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009, 57(2):116-124.
- [8] DABBAGH K, DAHLME, STEP ICK-BIEK P, et al. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2002, 168(9):4524-4530.
- [9] KIM J M, RUDENSKY A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212(1):86-98.
- [10] 杨思俊, 胡微煦, 文珠, 等. 冷应激对大鼠细胞免疫的影响[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(12):2215-2219.
- [11] ANDERSSON L I, HELLMAN P, ERIKSSON H. Receptor-mediated endocytosis of particles by peripheral dendritic cells[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(10):625-633.
- [12] 万幸, 王培训, 周联, 等. 脂多糖刺激前后小鼠肺肝脾组织中 Toll 样受体基因表达情况[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2):73-76.
- [13] ZHOU J, YAN J, LIANG H, et al. Epinephrine enhances the response of macrophages under LPS stimulation[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:254686.
- [14] MARGARYAN S, HYUSYAN A, MARTIROSYAN A, et al. Differential modulation of innate immune response by epinephrine and estradiol[J]. *Horm Mol Biol Clin Invest*, 2017, 30(3):46.
- [15] CASE A J, ZIMMERMAN M C. Redox-regulated suppression of splenic T-lymphocyte activation in a model of sympathoexcitation[J]. *Hypertension*, 2015, 65(4):916-923.
- [16] ESTRADA L D, AGAÇ D, FARRAR J D. Sympathetic neural signaling via the  $\beta_2$ -adrenergic receptor suppresses T-cell receptor-mediated human and mouse CD8<sup>+</sup> T-cell effector function[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(8):1948-1958.
- [17] COSMI L, LIOTTA F, LAZZERI E, et al. Human CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> thymocytes share phenotypic and functional features with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory thymocytes[J]. *Blood*, 2003, 102(12):4107-4114.
- [18] TAKENAKA M C, ARAUJO L P, MARICATO J T, et al. Norepinephrine controls effector T cell differentiation through  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B and P-1 in dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2016, 196(2):637-644.
- [19] KARLSSON I, MALLERET B, BROCHARD P, et al. FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cell induction during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques correlates with low CD4<sup>+</sup> T-cell activation and high viral load[J]. *J Virol*, 2007, 81(24):13444-13455.
- [20] MAHIC M, HENJUM K, YAQUB S, et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells by continuous antigen stimulation[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(3):640-646.