

• 论 著 •

## TIGIT 及其配体 CD155 在“怒”应激大鼠胸腺细胞中的表达及其意义\*

卢黄欣<sup>1</sup>, 陈俊贤<sup>1</sup>, 李伟婷<sup>2</sup>, 欧阳彦楚<sup>1</sup>, 杨军平<sup>2△</sup>

1. 江西中医药大学研究生院, 江西南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院检验科, 江西南昌 330006

**摘要:**目的 探讨“怒”模型大鼠胸腺细胞中 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(TIGIT)及其配体 CD155 和血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-10(IL-10)表达情况,以及这些指标与胸腺细胞凋亡的相关性。方法 将 48 只 Wistar 雄性大鼠随机分成对照组、模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组,每组 12 只。除对照组外,其余各组以“社会隔离法”结合足底电击法复制精神应激“怒”模型大鼠。实验后测定大鼠体质量和胸腺指数,以苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠胸腺组织的形态学改变,采用免疫印迹法检测各组大鼠胸腺细胞中 TIGIT、CD155 蛋白的表达水平,采用 Tunel 法检测胸腺细胞凋亡情况,采用酶联免疫吸附试验测定血清 CRH、ACTH、IL-2、IL-10 水平。结果 实验后,4 组大鼠体质量较试验前 1 d 升高( $P < 0.05$ ),且“怒”模型各组大鼠体质量均低于对照组( $P < 0.05$ );实验后“怒”模型各组大鼠胸腺指数均低于对照组( $P < 0.05$ )。HE 染色光学显微镜下( $\times 400$ )可见“怒”模型各组大鼠胸腺皮质组织结构出现不同程度的损坏,幼稚 T 细胞布排紊乱无序或呈“条索状”堆积,细胞间隙缩小,细胞数量较对照组降低,细胞核染色变浅,呈淡紫色,并出现不同程度核固缩、核分裂、细胞溶解等凋亡细胞增多现象。4 组大鼠胸腺细胞 TIGIT 蛋白表达水平比较,对照组<模型 21 d 组<模型 14 d 组<模型 7 d 组,其中模型 7 d 组、14 d 组与其他各组胸腺细胞 TIGIT 蛋白表达水平差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );“怒”模型各组大鼠胸腺细胞 CD155 蛋白表达水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。“怒”模型各组胸腺组织凋亡细胞吸光度高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型 7 d 组、模型 14 d 组血清 CRH、ACTH 水平高于对照组及模型 21 d 组( $P < 0.05$ );“怒”模型各组 IL-2 水平低于对照组( $P < 0.05$ ),且模型 7 d 组、模型 14 d 组低于模型 21 d 组( $P < 0.05$ );“怒”模型各组 IL-10 水平高于对照组( $P < 0.05$ ),且模型 14 d 组高于模型 7 d 组及模型 21 d 组( $P < 0.05$ )。Pearson 相关分析结果显示,TIGIT 表达水平与 CD155、ACTH、CRH 及胸腺细胞凋亡程度呈正相关( $P < 0.05$ ),与 IL-2 呈负相关( $P < 0.05$ ),与 IL-10 及胸腺指数无相关性( $P > 0.05$ );CD155 表达水平与 TIGIT 及胸腺细胞凋亡程度呈正相关( $P < 0.05$ ),与 IL-2 呈负相关( $P < 0.05$ ),与 ACTH、CRH、IL-10 及胸腺指数无相关性( $P > 0.05$ )。结论 “怒”应激状态下,胸腺出现萎缩及凋亡细胞增多现象,可能是 TIGIT-CD155 与下丘脑-垂体-肾上腺轴、IL-10、IL-2 共同作用所致,该研究为“怒”应激致使免疫损伤及疾病发生发展提供理论依据。

关键词: T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白; CD155; 应激; 胸腺; 免疫; 下丘脑-垂体-肾上腺轴

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.01.001 中图法分类号: R392

文章编号: 1673-4130(2022)01-0001-06 文献标志码: A

Expression and significance of TIGIT and its ligand CD155  
in thymocytes of rats under anger stress\*LU Huangxin<sup>1</sup>, CHEN Junxian<sup>1</sup>, LI Weiting<sup>2</sup>, OUYANG Yanchu<sup>1</sup>, YANG Junping<sup>2△</sup>

1. Department of Postgraduate, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China

**Abstract:** Objective To investigate the expression of T cell immunoglobulin and ITIM domain protein (TIGIT) and its ligand CD155 in thymocytes of rats under "anger" model and the expression of serum corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), interleukin-2 (IL-2) and interleukin-

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81860806)。

作者简介: 卢黄欣, 女, 硕士研究生在读, 主要从事中西医结合免疫学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: yyfjyp0507@126.com。

本文引用格式: 卢黄欣, 陈俊贤, 李伟婷, 等. TIGIT 及其配体 CD155 在“怒”应激大鼠胸腺细胞中的表达及其意义[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(1): 1-6.

10 (IL-10), as well as the correlation between these indicators and thymocyte apoptosis. **Methods** Forty-eight Wistar male rats were randomly divided into control group, model 7 d group, model 14 d group and model 21 d group, with 12 rats in each group. Except the control group, the mental stress "anger" model rats in the other groups were replicated by the "social isolation method" combined with the plantar electric shock method. After the experiment, the body mass and thymus indicators of rats were measured, the morphological changes of thymus tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the expression levels of TIGIT and CD155 protein in thymocytes of rats in each group were detected by Western blotting, the apoptosis of thymocytes was detected by the Tunel method, and the levels of serum CRH, ACTH, IL-2 and IL-10 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** After the experiment, the body mass of rats in the four groups increased compared with the day before the experiment ( $P < 0.05$ ), and the body mass of rats in the "anger" model group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ); after the experiment, the thymus index of "anger" model group was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Under the HE staining optical microscope ( $\times 400$ ), the thymic cortex structure of rats in each group of the "anger" model showed different degrees of structural damage, the arrangement of immature T cells was disordered or stacked in a "string" shape, and the intercellular space was narrowed, the number of cells decreased compared with the control group, the nucleus staining was lighter and light purple, and the apoptotic cells increased in varying degrees, such as nuclear pyknosis, mitosis and cytolysis. The comparison result of expression levels of TIGIT protein in thymocytes of the four groups is the control group  $<$  the model 21 d group  $<$  the model 14 d group  $<$  the model 7 d group, and there were significant differences in the expression levels of TIGIT protein among the model 7 d group and model 14 d group and other groups ( $P < 0.05$ ). The expression level of CD155 protein in thymocytes of rats in the "anger" model group was higher than that in the control group, and the differences was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The absorbance of apoptotic cells in thymus tissue of the "anger" model group was higher than that of control group, and the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The levels of serum CRH and ACTH in model 7 d group and model 14 d group were higher than those in control group and model 21 d group ( $P < 0.05$ ); the level of IL-2 in the "anger" model group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ), and the level of IL-2 in Model 7 d group and model 14 d group was lower than that in model 21 d group ( $P < 0.05$ ); the level of IL-10 in the "anger" model group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the level of IL-10 in the model 14 d group was higher than that in the model 7 d group and model 21 d group ( $P < 0.05$ ). Pearson correlation analysis results showed that TIGIT expression level was positively correlated with CD155, ACTH, CRH and thymocyte apoptosis ( $P < 0.05$ ), negatively correlated with IL-2 ( $P < 0.05$ ), and had no correlation with IL-10 and thymus index ( $P > 0.05$ ). CD155 expression level is positively correlated with TIGIT and thymocyte apoptosis ( $P < 0.05$ ), negatively correlated with IL-2 ( $P < 0.05$ ), and had no correlation with ACTH, CRH, IL-10 and thymus index ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Under the "anger" stress state, thymus atrophy and apoptotic cells increase, this research may be caused by the joint action of TIGIT-CD155 with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, IL-10 and IL-2, which provides a theoretical basis for immune injury and disease occurrence and development caused by "anger" stress.

**Key words:** T cell immunoglobulin and ITIM domain protein; CD155; stress; thymus; immunity; hypothalamic-pituitary-adrenal axis

T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白 (TIGIT) 是一种具有免疫球蛋白结构的新型共抑制信号分子<sup>[1]</sup>, 作为免疫调控受体, 也是 T 细胞活化、凋亡以及效应功能发挥过程中重要的信号分子, 其不仅对细胞的免疫激活、成熟、分化有直接调控作用, 还与细胞凋亡机制有密切联系<sup>[2]</sup>。TIGIT 可以与多种配体相结合发挥作用, 如 CD155、CD122、CD113, 其中 TIGIT 与 CD155 的亲合程度最高<sup>[3]</sup>。TIGIT 作为 T 细胞表

面的负性共抑制受体, 其细胞内的 ITIM 基序旁边还存在一个类似免疫球蛋白尾络氨酸 (ITT) 的磷酸化基序, 在 TIGIT 与 CD155 信号结合后, ITT 样基序在其基点 Tyr225 处磷酸化并与靶淋巴细胞中的适配器 Grb2 结合, 从而传递抑制性信号进而诱导 T 细胞凋亡, 降低机体免疫调控功能<sup>[4]</sup>。

研究表明, 在应激反应中, 机体可通过影响下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 的正常运转, 造成激素分

泌异常<sup>[5]</sup>;通过神经-内分泌-免疫调节(NEI)网络的过度调控造成免疫损伤,导致胸腺出现萎缩,胸腺细胞出现衰竭<sup>[6]</sup>;相关研究表明,特异性活跃表达于各种 T 细胞亚群和自然杀伤(NK)细胞中的 TIGIT 可通过影响 T 细胞自身活化通路或结合多种合作细胞干扰免疫因子的分泌,造成直接或间接的免疫功能抑制,并诱导免疫细胞衰竭<sup>[7]</sup>,同时 TIGIT 可与 CD155 结合,传递抑制性信号,诱导 T 细胞凋亡,降低机体免疫调控功能。本研究通过分析不同时程应激“怒”模型大鼠中促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)及相关免疫因子白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-10(IL-10)表达水平,探讨“怒”情志对免疫功能的影响,分析不同时程应激“怒”模型大鼠胸腺中 TIGIT 及其配体 CD155 的蛋白表达水平和胸腺 T 细胞凋亡率,以及 TIGIT 分子在应激反应中与胸腺 T 细胞凋亡及外周免疫功能紊乱的相关性。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 48 只,雄性 SPF 级 SD 大鼠 12 只,均为 8 周龄,体质量为 180~200 g;2 种品系的大鼠均由济南鹏悦实验动物繁育有限公司提供。动物合格证号:SCXK(鲁)2019-0003,饲养于江西中医药大学生命科学院基础实验室动物实验中心。购置后,随机分笼适应性饲养 7 d,饮食不限,环境湿度 35%~45%,温度(20±4)℃,采用自动明暗系统(7:00 照明,19:00 熄灯);7 d 后,Wistar 大鼠随机分为 4 组,对照组、模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组,每组 12 只,对照组每 6 只 1 笼,模型各组分别单笼(50 cm×30 cm×20 cm)独立饲养。SD 大鼠作为入侵鼠,每 6 只 1 笼,实验结束后放弃不用。对照组 Wistar 大鼠与 SD 大鼠放置于同一饲养房间,模型组 Wistar 大鼠放置于另外一个饲养房间。实验已经通过江西中医药大学动物实验伦理委员会审查,审查批号:JZLLSC2019-0153。

**1.2 仪器与试剂** PowerPac™ 通用 Bio-Rad 电泳仪购自上海一恒科技有限公司。TIGIT 多克隆抗体(批号 PAN056Ra)、CD155 抗体(批号 PAB550Ra01)均购自美国 Cloud-Clone Corp. 公司;内参  $\beta$ -actin 抗体(批号 mAbcam8266)购自美国 mAbcam 公司;一步法 Tunel 细胞凋亡原位检测试剂盒(绿色 FITC 标记荧光检测法,通用型)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;CRH、ACTH、IL-2、IL-10 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 大鼠应激“怒”模型制备** 参照文献[8-9]方

法,采用“社会隔离法”结合足底电击法对独立饲养的 Wistar 大鼠复制精神应激“怒”模型。社会隔离法:制造昼夜颠倒的生存环境,每晚 19:00 开灯,上午 7:00 熄灯,饮食不限,持续 14 d(对照组大鼠与入侵鼠在正常光照节律房间饲养);从第 15 天开始,每天 13:30—15:30 进行入侵鼠干扰(随机选取 1 只入侵鼠放入独立饲养笼中接触模型大鼠,持续 15 min);从第 15 天开始,每天 16:00—17:30 进行不可避免的足底电击(电击棒 4 000 V, <0.5 mA,脉冲 15 s,持续 15 min)。模型大鼠结合性刺激分别持续 7、14、21 d,完成应激“怒”模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组大鼠制备,对照组大鼠不进行任何刺激。

**1.3.2 取材及称质量** 记录 4 组大鼠实验前 1 d 及实验后体质量,实验完成后采取颈椎脱臼法处死大鼠,取出胸腺,以生理盐水浸洗 2 次、定性滤纸吸干液体并称质量记录,计算胸腺指数,胸腺指数=胸腺净质量/体质量(mg/g)。

**1.3.3 HE 染色** 胸腺标本用 4%多聚甲醛固定,进行包埋、脱水、透明和浸蜡,将蜡块固定于切片机,切下 2~4  $\mu$ m 厚度的胸腺组织于 40℃水中,60℃烘烤 2 h。经脱蜡、染色、透明和封片,于高清显微镜下拍照。

**1.3.4 胸腺细胞 TIGIT、CD155 蛋白表达水平测量(免疫印迹法)** 提取各组大鼠胸腺组织蛋白,经过灌胶、上样、转模、封闭、洗膜等工作后,分别浸入 TIGIT、CD155、内参一抗中孵育过夜,洗膜,孵育二抗完成后进行显影,用软件 Alphaview SA 分析蛋白条带的相对灰度值。

**1.3.5 Tunel 法检测胸腺细胞凋亡率** 按照 1.3.3 步骤将胸腺组织切片后进行脱蜡,透明,然后放入盛有 pH 值 6.0 的枸橼酸盐缓冲液的烧杯中,92℃加热 30 min,进行磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,用免疫组化笔外圈标记,按照 Tunel(FITC)Kit 试剂盒说明书进行荧光染色,随机选取染色完成后的分组标本的切片,随机视野下拍照,以 Image-Pro Plus6.0 图像分析系统进行吸光度分析,并计算平均吸光度,分析胸腺 T 细胞凋亡率。

**1.3.6 血清 CRH、ACTH、IL-2、IL-10 水平测量** 采用真空无菌采血管取 2 mL 血液,以 3 000 r/min 离心 15 min,用移液枪抽吸“透亮”上清液,转移至 EP 管待测。后续操作过程严格遵从 ELISA 试剂盒说明书进行。

**1.4 统计学处理** 用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,“怒”模型各组与对照组比较采用 Dunnett-*t* 检验,实验前后比较采用配对样本 *t* 检验。计数资料以只数表示。采用 Pearson 相关进行

相关性分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 4 组大鼠实验前后体质量及实验后胸腺指数比较** 实验前 1 d, 4 组大鼠体质量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 实验后 4 组大鼠体质量均较实验前 1 d 升高 ( $P < 0.05$ ), 但“怒”模型各组大鼠体质量均低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 实验后“怒”模型各组大鼠胸腺指数均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

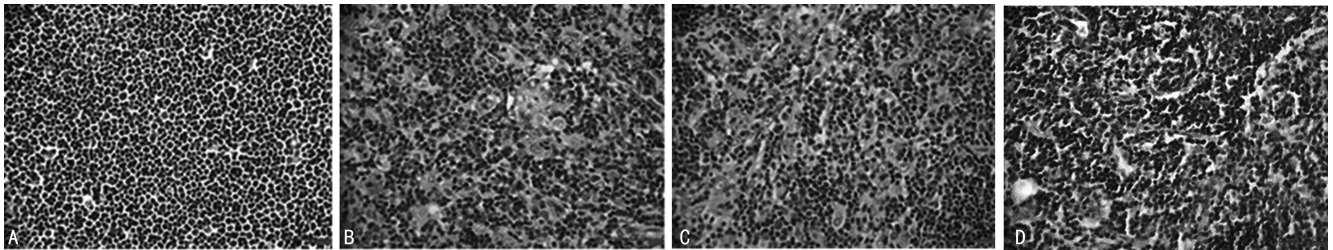
**2.2 4 组大鼠胸腺组织形态学观察** 光学显微镜下 ( $\times 400$ ) 观察可见: 对照组大鼠胸腺皮质部饱满, 幼稚 T 细胞布排整齐, 细胞间隙疏松, 结构分明, 其细胞核染色较深, 呈深蓝紫色, 出现少量巨噬细胞呈淡红色 (图 1A)。“怒”模型各组大鼠胸腺皮质组织结构出现不同程度的损坏, 幼稚 T 细胞布排紊乱无序或呈“条索状”堆积, 细胞间隙缩小, 细胞数量较对照组降低,

细胞核染色变浅, 呈淡紫色, 并出现不同程度的核固缩、核分裂、细胞溶解等凋亡细胞增多现象, 其中以模型 7 d 组、模型 14 d 组较为明显 (图 1B、C、D)。

表 1 4 组大鼠实验前后体质量及实验后胸腺指数

| 组别        | n  | 体质量(g)        |                              | 胸腺指数<br>(mg/g)           |
|-----------|----|---------------|------------------------------|--------------------------|
|           |    | 实验前 1 d       | 实验后                          |                          |
| 对照组       | 12 | 182.75 ± 4.69 | 267.67 ± 10.33 <sup>b</sup>  | 1.89 ± 0.26              |
| 模型 7 d 组  | 12 | 182.42 ± 6.47 | 243.33 ± 8.38 <sup>ab</sup>  | 1.49 ± 0.31 <sup>a</sup> |
| 模型 14 d 组 | 12 | 183.08 ± 5.20 | 235.67 ± 9.84 <sup>ab</sup>  | 1.35 ± 0.27 <sup>a</sup> |
| 模型 21 d 组 | 12 | 184.17 ± 8.10 | 233.50 ± 11.78 <sup>ab</sup> | 0.95 ± 0.21 <sup>a</sup> |
| F         |    | 3.638         | 10.783                       | 12.903                   |
| P         |    | >0.05         | <0.05                        | <0.05                    |

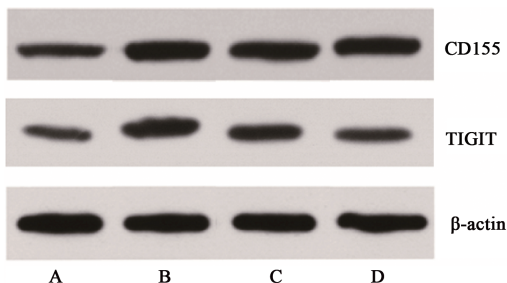
注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与实验前 1 d 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



注: A、B、C、D 分别为对照组、模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组大鼠胸腺组织 HE 染色 ( $\times 400$ ), 标尺为 200px。

图 1 实验后 4 组大鼠胸腺组织 HE 染色结果

**2.3 4 组大鼠胸腺细胞 TIGIT、CD155 蛋白表达水平比较** 4 组大鼠胸腺细胞 TIGIT 蛋白表达水平比较, 模型 7 d 组、模型 14 d 组高于对照组, 模型 7 d 组高于模型 14 d 组、模型 21 d 组, 模型 14 d 组高于模型 21 d 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); “怒”模型各组大鼠胸腺细胞 CD155 蛋白表达水平比较, 模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 2、3。

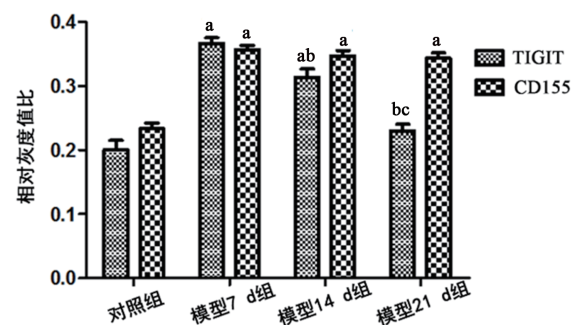


注: A、B、C、D 分别为对照组、模型 7 d 组、模型 14 d 组、模型 21 d 组大鼠胸腺 TIGIT 和 CD155 蛋白表达水平。

图 2 4 组大鼠胸腺细胞 TIGIT 和 CD155 蛋白表达水平

**2.4 4 组大鼠胸腺 T 细胞的凋亡率比较** 荧光显微镜下 ( $\times 400$ ), 以发射波长 515~565 nm 观察, 可见胸腺凋亡细胞呈绿色荧光; DAPI 阴性复染, 以发射波长 340~380 nm 观察, 可见凋亡细胞以外区域正常细胞

胞核呈蓝色荧光。4 组大鼠胸腺组织凋亡细胞的吸光度比较, 模型 7 d 组 ( $19.92 \pm 4.04$ )、模型 14 d 组 ( $13.53 \pm 1.56$ )、模型 21 d 组 ( $7.97 \pm 1.37$ ) 高于对照组 ( $5.01 \pm 1.35$ ), 模型 7 d 组高于模型 14 d 组、模型 21 d 组, 模型 14 d 组高于模型 21 d 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型 7 d 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与模型 14 d 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 4 组大鼠胸腺细胞 TIGIT/ $\beta$ -actin 和 CD155/ $\beta$ -actin 的相对灰度值比

**2.5 实验后 4 组大鼠血清 CRH、ACTH、IL-2、IL-10 水平比较** 血清 CRH、ACTH 水平比较, 模型 7 d 组、模型 14 d 组高于对照组及模型 21 d 组 ( $P < 0.05$ ); IL-2 水平比较, “怒”模型各组均低于对照组

( $P<0.05$ ),且模型 7 d 组、模型 14 d 组低于模型 21 d 组( $P<0.05$ );IL-10 水平比较,“怒”模型各组均高于对照组( $P<0.05$ ),且模型 14 d 组高于模型 7 d 组及模型 21 d 组( $P<0.05$ )。见表 2。

**2.6 TIGIT、CD155 表达水平与 ACTH、CRH、IL-2、IL-10、胸腺指数、胸腺细胞凋亡程度的相关性分析**  
Pearson 相关分析显示,TIGIT 的表达水平与 CD155、

ACTH、CRH、胸腺细胞凋亡程度呈正相关( $P<0.05$ ),与 IL-2 呈负相关( $P<0.05$ ),与 IL-10、胸腺指数无相关性( $P>0.05$ );CD155 的表达水平与 TIGIT、胸腺细胞凋亡程度呈正相关( $P<0.05$ ),与 IL-2 呈负相关( $P<0.05$ ),与 ACTH、CRH、IL-10、胸腺指数无相关性( $P>0.05$ )。见表 3。

表 2 实验后 4 组大鼠血清 CRH、ACTH、IL-2、IL-10 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | <i>n</i> | CRH(ng/mL)              | ACTH(pg/mL)                | IL-2(pg/mL)              | IL-10(pg/mL)              |
|-----------|----------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 对照组       | 12       | 7.20±3.53               | 218.69±47.40               | 10.45±1.93               | 17.10±3.54                |
| 模型 7 d 组  | 12       | 18.13±3.62 <sup>a</sup> | 509.26±73.15 <sup>a</sup>  | 5.27±1.37 <sup>a</sup>   | 34.54±5.16 <sup>a</sup>   |
| 模型 14 d 组 | 12       | 15.63±2.58 <sup>a</sup> | 472.79±136.40 <sup>a</sup> | 6.45±1.75 <sup>a</sup>   | 50.83±16.89 <sup>ab</sup> |
| 模型 21 d 组 | 12       | 8.95±4.71 <sup>bc</sup> | 231.31±54.25 <sup>bc</sup> | 8.41±3.50 <sup>abc</sup> | 29.22±7.86 <sup>ac</sup>  |
| <i>F</i>  |          | 11.629                  | 11.651                     | 15.826                   | 12.860                    |
| <i>P</i>  |          | <0.05                   | <0.05                      | <0.05                    | <0.05                     |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型 7 d 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型 14 d 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

表 3 TIGIT、CD155 表达水平与 ACTH、CRH、IL-2、IL-10、胸腺指数、胸腺细胞凋亡程度的相关性

| 指标    | CD155    |          | TIGIT    |          | ACTH     |          | CRH      |          |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|       | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> |
| TIGIT | 0.701    | <0.01    | —        | —        | 0.585    | <0.05    | 0.697    | <0.01    |
| CD155 | —        | —        | 0.701    | <0.01    | 0.285    | >0.05    | 0.447    | >0.05    |

| 指标    | IL-2     |          | IL-10    |          | 胸腺指数     |          | 胸腺细胞凋亡程度 |          |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|       | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> |
| TIGIT | -0.690   | <0.01    | 0.288    | >0.05    | 0.086    | >0.05    | 0.863    | <0.01    |
| CD155 | -0.570   | <0.05    | -0.317   | >0.05    | 0.099    | >0.05    | 0.562    | <0.05    |

注:—表示无数据。

### 3 讨 论

随着健康概念的更新和现代医学模式的改变,“怒”等负性情绪在疾病发生、发展中的作用和机制已成为研究热点。中医学理论之七情致病论也认为情志与健康 and 疾病密切相关,其中“怒”情志首伤肝,肝失疏泄,则诸病丛生。研究表明,“肝主疏泄”是机体调控免疫系统功能活动的核心,与心理应激的免疫功能调控密切相关<sup>[10]</sup>。同时,长期心理应激和情绪异常容易导致机体 NEI 网络被过度激活,HPA 轴分泌异常,进一步诱发多系统组织细胞损伤,从而增加自身免疫系统疾病、癌症、精神性疾病等的患病可能性<sup>[11-12]</sup>。

在情志致病模型中,“怒伤肝”类型是相对研究广泛且较为成功的一种。本实验参照文献[8-9]方法,采用“足底电击”和“社会隔离入侵”的方法制备“怒伤肝”模型大鼠。其中“社会隔离法”由国外学者 DA-VIS 发明,该法对大鼠进行长期的单独隔离并日夜颠倒饲养,有利于使动物进入“孤立无援”的生存状态,

由此提高大鼠对环境刺激的敏感性,加入入侵鼠干扰以及足底电击更能充分体现躯体性、社会性、心理性三类应激源因素,在造模期间,大鼠表现为怒叫、呼吸加速、易激怒等明显盛怒现象。

国外最新研究发现,身体应激和心理应激能够引起 TIGIT 高表达,其对 T 细胞存在抑制性作用<sup>[13]</sup>,并发现 TIGIT 的表达与在 T 细胞衰竭中起关键作用的几种抑制调节因子的上调有关<sup>[14]</sup>,同时,研究发现,TIGIT 和 CD155 表达水平的升高与多种免疫系统疾病的发病机制、不良预后密切相关<sup>[15-16]</sup>。本实验免疫印迹法结果显示,各模型组大鼠胸腺的 TIGIT 和 CD155 蛋白的表达水平均有所上升,而 CD155 蛋白呈持续高水平表达趋势,以应激 7 d 时效果最为明显,提示了应激反应中大鼠胸腺幼稚 T 细胞的凋亡可能与 TIGIT-CD155 轴的表达活性存在正相关关系。目前应激反应中的 NEI 网络存在多种机制相互协助,共同介导免疫抑制效应<sup>[17]</sup>。本实验通过不同时程的慢性“怒”应激能有效提高大鼠血清中 CRH、ACTH 的

分泌水平,提示“怒”应激大鼠 HPA 轴功能亢进并成功处于应激状态,另外 Tunel 法结果显示模型组大鼠胸腺皮质部幼稚 T 细胞的凋亡率明显高于对照组,以应激 7 d 时效果最为明显,而胸腺指数持续降低,说明了在应激反应中,大鼠的胸腺抑制与 HPA 轴兴奋有直接关系。研究表明树状突细胞(DC)上的 CD155 与 TIGIT 相结合,使 DC 的分泌格局发生改变,促进抑制因子 IL-10 水平升高,活化因子 IL-2 水平下降,间接抑制 T 细胞的活化<sup>[18]</sup>。在本实验中模型大鼠血清正性免疫调节因子 IL-2 水平明显降低,而负性免疫调节因子 IL-10 水平明显上升,符合 TIGIT-CD155 轴对 DC 的免疫负调节作用。同时,本实验通过对 TIGIT 及其配体 CD155 进行相关性分析,结果提示 TIGIT、CD155 与 HPA 轴、IL-2 密切相关,共同作用抑制免疫应答。值得注意的是,在此实验中 TIGIT、ACTH、CRH、IL-2 的水平变化及胸腺细胞凋亡程度均在模型 7 d 组效果最为明显,而模型 14 d 组次之,模型 21 d 组趋于正常;而各模型组 CD155 表达水平均明显高于对照组( $P < 0.05$ ),但各模型组间对比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果提示表达阈值及胸腺细胞凋亡情况可能与随应激时间延长机体对应激源出现“适应性”改变或者通过机体“内环境”的稳态调整进行修复等有关<sup>[19]</sup>,其中 IL-10 表达水平呈现上调趋势,以模型 14 d 组最为突出,其结果可能与应激状态下细胞因子释放时间的早晚有关;胸腺指数的持续降低可能与应激后体质量保持持续低值有关,其原因尚需更多研究说明。

综上所述,“怒”应激可致 HPA 轴调节功能紊乱及免疫耐受能力下降,同时应激反应所造成的胸腺萎缩和胸腺细胞凋亡,可能是 TIGIT-CD155 轴以及 HPA 轴、IL-10、IL-2 共同作用的结果。其结果需要进一步扩大研究范围深入探讨。本研究为阐述“怒”应激致使免疫功能损伤提供新角度,旨在强调避免“怒”情志发生,预防疾病发生或复发,为提高临床疗效提供新思路。

## 参考文献

- [1] NI L, DONG C. New checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1):52-65.
- [2] CHAN C J, MARTINET L, GILFILLAN S, et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions[J]. Nat Immunol, 2014, 15(5):431-438.
- [3] ANDERSON A C, JOLLER N, KUCHROO V K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. Immunity, 2016, 44(5):989-1004.
- [4] FUHRMAN C, AYEYEH W I, SEAY H R, et al. Divergent phenotypes of human regulatory T cells expressing the receptors TIGIT and CD226[J]. J Immunol, 2015, 195(1):145-155.
- [5] 史亚飞, 张彩霞, 徐志伟, 等. 加味四逆散对慢性轻度不可预计性心理应激模型大鼠神经内分泌免疫网络调控作用的研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2):362-365.
- [6] 黄文琴, 魏大能, 周奇志, 等. 电针对焦虑大鼠胸腺组织形态、心钠肽和利钠肽受体-A 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2):216-221.
- [7] 何文涛, 陈茜, 余学锋. 共抑制分子 TIGIT 的研究进展[J]. 现代免疫学, 2014, 34(5):436-438.
- [8] 李越峰, 司昕蕾, 曹瑞, 等. 四逆散对创伤后应激障碍及睡眠障碍大鼠海马区神经元放电波幅的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(10):1203-1205.
- [9] WEI S, ZHANG H Y, GAO J, et al. Impact of social isolation and resident intruder stress on aggressive behavior in the male rat[J]. Neural Regen Res, 2010, 5(15):1175-1179.
- [10] 赵昌林. 肝主疏泄为调控免疫功能的核心[J]. 中医杂志, 2017, 58(7):568-571.
- [11] 赵敏, 张纪岩. 慢性心理应激与免疫[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(7):961-966.
- [12] 敖海清, 徐志伟, 严灿. 心理应激相关疾病的研究探索[J]. 中医药学刊, 2004(8):1414-1415.
- [13] RUDAK P T, GANGIREDDY R, CHOI J, et al. Stress-elicited glucocorticoid receptor signaling upregulates TIGIT in innate-like invariant T lymphocytes[J]. Brain Behav Immun, 2019, 80(8):793-804.
- [14] KONG Y X, ZHU L L, SCHELL T D, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(12):3057-3066.
- [15] SANCHEZ-CORREA B, VALHONDO I, HASSOUNEH F, et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE axis: novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy[J]. Cancers(Basel), 2019, 11(6):877-892.
- [16] SUN Y, LUO J P, CHEN Y S, et al. Combined evaluation of the expression status of CD155 and TIGIT plays an important role in the prognosis of LUAD (lung adenocarcinoma)[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80(3):106198.
- [17] 赵敏, 张纪岩. 慢性心理应激与免疫[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(7):961-966.
- [18] NEGISHI N, SATO T, YAMASHITA-KANEMARU Y, et al. CD155-transducing signaling through TIGIT plays an important role in transmission of tolerant state and suppression capacity[J]. Immunohorizons, 2018, 2(10):338-348.
- [19] 陈俊贤, 李玮婷, 杨军平, 等. 免疫调控受体 TIGIT 在“怒”模型大鼠胸腺及外周血单个核细胞表达的意义[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(26):4183-4189.