

大面积烧伤脓毒症患者 T 淋巴细胞免疫功能的改变及临床意义

董宁 姚咏明 曹玉珏 贺立新 于燕 柴家科 盛志勇

【摘要】 目的 了解大面积烧伤脓毒症患者 T 淋巴细胞免疫功能的变化,探讨其与脓毒症的关系。**方法** 选择 59 例烧伤面积 $\geq 30\%$ TBSA 的患者,分为脓毒症组 43 例和非脓毒症组 16 例。采集两组患者伤后 1、3、5、7、14、21、28 d 的外周静脉血,检测 T 淋巴细胞增殖能力和白细胞介素 2(IL-2)的分泌水平,并行相关性分析;通过流式细胞仪检测 CD3⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞的百分率及其凋亡率,并行相关性分析。**结果** 与非脓毒症组比较,脓毒症组患者伤后 1、14、21、28 d T 淋巴细胞增殖能力和 IL-2 的分泌水平均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),两指标呈显著正相关 ($r = 0.82, P < 0.01$)。伤后 1、5、14、21、28 d,脓毒症组患者 CD3⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞百分率明显低于非脓毒症组,而其凋亡率呈相反趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),两指标呈显著负相关 ($r = -0.66, P < 0.05$)。**结论** 大面积烧伤脓毒症患者 T 淋巴细胞免疫功能持续处于抑制状态,T 淋巴细胞凋亡参与了脓毒症细胞免疫紊乱的病理生理过程。

【关键词】 烧伤; 脓毒症; T 淋巴细胞; 免疫活性

The clinical significance of changes in immunological function of T lymphocyte in severe burn patients with sepsis DONG Ning, YAO Yong-ming, CAO Yu-jue, HE Li-xin, YU Yan, CHAI Jia-ke, SHENG Zhi-yong. Burn Institute, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, P. R. China Corresponding author: YAO Yong-ming, Email: c_ff@sina.com, Tel: 010-66867394

【Abstract】 Objective To observe the immunological function changes in T lymphocyte in severe burn patients with sepsis, and to explore its relationship with sepsis. **Methods** Fifty-nine burn patients with burn surface exceeding 30% TBSA were enrolled in the study, and they were divided into sepsis group (S, n=43) and non-sepsis group (NS, n=16). The peripheral venous blood samples of the patients in both groups were collected on 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 post-burn days (PBD). The T lymphocyte proliferation ability and the interleukin-2 (IL-2) level in both groups were observed and the correlation between them were analyzed. The percentage of CD3⁺/CD4⁺ T lymphocytes and its apoptosis rate were determined by flow cytometry and the correlation between them was analyzed. **Results** Compared with that in NS group, the proliferation ability of T lymphocyte and the level of IL-2 were significantly decreased in patients in S group on 1, 14, 21, and 28 PBD ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The inhibition of T lymphocyte proliferation was positively correlated to the low level of IL-2 production in burn patients ($r = 0.82, P < 0.01$). The percentage of CD3⁺/CD4⁺ T lymphocytes in S group were obviously lower than that in NS group on 1, 5, 14, 21, 28 PBD, whereas on opposite tendency in the apoptosis rate of CD3⁺/CD4⁺ T lymphocytes were found at the same time ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of CD3⁺/CD4⁺ T lymphocytes was negatively correlated to apoptosis rate of T lymphocytes ($r = -0.66, P < 0.05$). **Conclusion** The immunological function of T lymphocyte in severely burn patients with sepsis is depressed persistently. Apoptosis of T lymphocyte may participate in the pathological process of cell immunological disorder induced by sepsis.

【Key words】 Burns; Sepsis; T Lymphocytes; Immunocompetence

脓毒症是严重烧(创)伤患者的常见并发症之一。近年来的动物实验结果提示,脓毒症的发生与机体免疫功能紊乱密切相关,其中特异性细胞免疫

功能抑制是其重要特征。但严重烧伤并发脓毒症时,细胞免疫功能改变的临床意义尚有待阐明^[1,2]。笔者通过对大面积烧伤患者外周血中 T 淋巴细胞免疫功能进行动态观察,拟探讨烧伤后 T 淋巴细胞免疫功能紊乱与脓毒症发生的关系及其临床意义。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2005CB522602);国家杰出青年科学基金(30125020);首都医学发展科研基金(2003-2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所(董宁、姚咏明、于燕、柴家科、盛志勇);北京医院协会佑安医院烧伤科(曹玉珏、贺立新)

通讯作者:姚咏明,Email: c_ff@sina.com,电话:010-66867394

1 对象与方法

1.1 临床资料

选择 2004 年 6 月—2005 年 12 月收治的 59 例



烧伤总面积 $\geq 30\%$ TBSA 的患者,其中男 46 例、女 13 例,年龄 17 ~ 62 岁 $[(35 \pm 11)$ 岁]。根据患者的临床表现及烧伤脓毒症诊断标准^[3],将其分为:脓毒症组 43 例,烧伤总面积 30% ~ 95% $[(71 \pm 17)\%]$ 、其中 III 度面积 $(48 \pm 18)\%$ TBSA,脓毒症始发时间为伤后 (6.6 ± 2.4) d;非脓毒症组 16 例,烧伤总面积 30% ~ 75% $[(47 \pm 10)\%]$ 、其中 III 度面积 $(20 \pm 8)\%$ TBSA。分别于患者伤后 1、3、5、7、14、21、28 d 采集其外周静脉血标本待测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 外周血 T 淋巴细胞的分离 采用含乙二醇四乙酸二钾的无致热原试管(美国 BD 公司)收集血液标本 3 ml,并与同体积的无菌等渗盐水混匀,缓慢置于无菌、无致热原的聚蔗糖-泛葡葡胺液面上,18 ~ 20 °C、1 500 × g 离心 20 min,吸取第 2 层呈云雾状的单个核细胞层,离心洗涤后去除红细胞。利用单核细胞和多形核白细胞可黏附塑料及毛细玻璃管的特性,进一步分离和纯化淋巴细胞。锥虫蓝检测细胞活性 > 97%,计数细胞,调整其浓度为 5×10^6 个/ml 待用。

1.2.2 T 淋巴细胞增殖能力的测定 用含体积分数 20% 胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml,取 0.1 ml 接种于 96 孔培养板,加 100 μ l 植物血凝素(20 μ g/ml,美国 Sigma 公司)进行刺激。采用上述培养液与 100 μ l 植物血凝素混匀作为调零孔,设 3 个复孔。于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中孵育 68 h,轻轻吸弃 100 μ l 上清液,再向各孔加入 5 g/L 噻唑蓝 10 μ l,轻微混匀,继续培养 4 h。加入 100 μ l Triton X 100-异丙醇溶液,常规孵育过夜,测定波长 540 nm 下的吸光度(A)值。

1.2.3 白细胞介素 2(IL-2)水平检测 向 96 孔培养板分别加入 2×10^6 个/ml 的 T 淋巴细胞悬液 100 μ l、含体积分数 20% FCS 的 RPMI 1640 培养液 100 μ l,再加入 20 μ g/ml 植物血凝素 100 μ l。孵箱常规孵育 24 h,吸取 100 μ l 上清液,按照人 IL-2 酶联免疫吸附测定试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)说明书进行检测,分别计算出校正曲线和回归

方程,将样品 A 值代入校正曲线计算 IL-2 水平。

1.2.4 CD3⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞百分率检测 采用磷酸盐缓冲液(PBS)将分离好的外周血单个核细胞浓度调至 1×10^6 个/ml,吸取 100 μ l 悬液加入流式管内,再加入 CD3-异硫氰酸荧光素(FITC)20 μ l、CD4-别藻蓝素(APC)20 μ l,避光混匀 15 min 后,加入 400 μ l PBS。流式细胞仪检测 CD3⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞百分率。所用荧光标记抗体和流式细胞仪均购自美国 BD Pharmingen 公司。

1.2.5 CD3⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞凋亡率检测 采用 PBS 将分离好的外周血单个核细胞浓度调至 1×10^6 个/ml,离心弃上清液,用 0.1 ml 结合缓冲液将细胞沉淀悬浮于流式管中。再加入 CD3-FITC 20 μ l、CD4-APC 20 μ l、膜联蛋白 V 5 μ l 和 7-氨基放线菌素 D 5 μ l,避光孵育 15 min。加入 0.4 ml 结合缓冲液,1 h 内上流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析、t 检验。

2 结果

2.1 T 淋巴细胞增殖能力

与正常人外周血 T 淋巴细胞增殖能力 (1.27 ± 0.32) 比较,脓毒症组与非脓毒症组患者该增殖能力明显受到抑制($P < 0.01$)。与非脓毒症组比较,脓毒症组伤后 1、14、21、28 d T 淋巴细胞增殖能力显著受到抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且伤后 3 ~ 28 d 持续处于较低水平。见表 1。

2.2 IL-2 水平

伤后脓毒症组的 IL-2 水平一直处于较低水平,且在伤后 1、14、21、28 d 明显低于非脓毒症组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 外周血 T 淋巴细胞增殖能力与 IL-2 水平的相关性分析

烧伤后外周血 T 淋巴细胞的增殖抑制与 IL-2 水平的下降呈显著正相关($r = 0.82, P < 0.01$)。直线方程 $Y = 28.10X - 6.41$,X 表示外周血 T 淋巴细胞增殖能力,Y 表示 IL-2 水平。

表 1 两组烧伤患者外周血 T 淋巴细胞增殖能力的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(d)						
		1	3	5	7	14	21	28
脓毒症组	43	0.74 ± 0.14 ^{ac}	0.54 ± 0.15 ^a	0.61 ± 0.27 ^a	0.64 ± 0.29 ^a	0.67 ± 0.22 ^{ab}	0.53 ± 0.18 ^{ac}	0.69 ± 0.08 ^{ac}
非脓毒症组	16	0.91 ± 0.29 ^a	0.52 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.31 ^a	0.76 ± 0.45 ^a	0.84 ± 0.30 ^a	0.95 ± 0.26 ^a	1.13 ± 0.34 ^a

注:数据以吸光度值表示;正常人外周血 T 淋巴细胞增殖能力为 1.27 ± 0.32 ,与其比较,a: $P < 0.01$;与非脓毒症组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$

2.4 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率

与非脓毒症组比较,脓毒症组患者除伤后 3 d 外各时相点 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率降低;伤后 1、5、14、21、28 d 组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。非脓毒症组 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率仅在伤后第 3 天显著下降,其他时相点无明显变化。见表 3。

2.5 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞凋亡率

伤后第 14、21 天,脓毒症组患者 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞凋亡率分别约为非脓毒症组的 1.7、2.0 倍 ($P < 0.01$);伤后第 1、5、28 天组间比较,差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.6 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率与其凋亡率的相关性分析

烧伤后 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率与其凋亡率呈显著负相关 ($r = -0.66, P < 0.05$)。直线方程 $Y = -0.41X + 30.74$, X 表示 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率, Y 表示其凋亡率。

3 讨论

脓毒症的发病过程中,机体并非总是处于一成不变的炎性反应及免疫激活状态。研究表明,免疫功能抑制同样也是脓毒症的重要特征,抗原特异性 T、B 淋巴细胞的清除或失活在其中起着重要作用^[2]。脓毒症的初始阶段,大量分泌炎性介质为其主要特征;随后机体可能进入了一个免疫抑制阶段^[4],表现为淋巴细胞的增殖能力下降、IL-2 产生减少和大量淋巴细胞凋亡等,从而使机体对病原体的易感性明显增加^[2]。

T 淋巴细胞具有细胞免疫效应功能及免疫调节功能,在它的激活过程中,IL-2 是其增殖的必要条件,以自、旁分泌和内分泌形式作用于 T 淋巴细胞,而 T 淋巴细胞的活化又制约着特异性免疫应答^[5]。本研究动态监测了严重烧伤患者外周血 T 淋巴细胞增殖能力、IL-2 的分泌水平,观察到脓毒症组 T 淋巴细胞增殖能力及 IL-2 的分泌水平在伤后 1、14、21、28 d 显著低于非脓毒症组;非脓毒症组于伤后 14 d 起两者水平逐渐回升。相关性分析显示,严重烧伤后外周血 T 淋巴细胞增殖能力和 IL-2 分泌水平呈显著正相关。上述结果表明,大面积烧伤后发生脓毒症的患者 T 淋巴细胞免疫功能持续处于抑制状态,从而导致机体对病原体的易感性明显增加,进一步促进脓毒症的发展。

有研究显示,烧伤后丝裂原可诱导 IL-2 的产生水平及其受体表达能力均明显下降^[6],与本研究结果相符,原因可能与 T 淋巴细胞的信号缺陷有关,包括 Ca²⁺ 或酪氨酸激酶信号通路障碍。同时,烧伤后巨噬细胞与 T 淋巴细胞的免疫功能异常密切相关,如大量前列腺素 E₂ 分泌能抑制 T 淋巴细胞增殖和 IL-2 的产生^[7],烫伤小鼠巨噬细胞直接或间接影响 T 淋巴细胞的增殖^[8]。此外,核因子 AT(NF-AT) 和激活蛋白 1(AP-1) 对 IL-2 的生成和 T 淋巴细胞增殖至关重要。T 淋巴细胞活化后,NF-AT 发生去磷酸化,并转移到细胞核内与 AP-1 结合,成为具有转录活性的 NF-AT^[8,9]。

在脓毒症发展过程中,人们逐渐认识到免疫功能紊乱与大量淋巴细胞凋亡密切相关,凋亡被认为

表 2 两组烧伤患者外周血 T 淋巴细胞分泌白细胞介素 2 水平的比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(d)						
		1	3	5	7	14	21	28
脓毒症组	43	9.7 ± 1.2 ^b	9.3 ± 1.0	10.7 ± 1.6	9.9 ± 1.4	10.8 ± 1.9 ^b	10.4 ± 2.3 ^a	12.9 ± 5.4 ^a
非脓毒症组	16	22.6 ± 12.0	9.6 ± 0.9	10.0 ± 1.2	9.8 ± 1.6	26.5 ± 16.2	19.0 ± 17.0	23.7 ± 19.4

注:与非脓毒症组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

表 3 两组烧伤患者外周血 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞百分率的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(d)						
		1	3	5	7	14	21	28
脓毒症组	43	26 ± 11 ^b	30 ± 12	31 ± 9 ^a	31 ± 11	33 ± 15 ^a	30 ± 11 ^b	26 ± 11 ^b
非脓毒症组	16	40 ± 5	29 ± 8	37 ± 7	35 ± 7	43 ± 9	41 ± 8	40 ± 9

注:与非脓毒症组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

表 4 两组烧伤患者外周血 CD3⁺/CD4⁺T 淋巴细胞凋亡率的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(d)						
		1	3	5	7	14	21	28
脓毒症组	43	18.8 ± 7.3 ^a	18.0 ± 6.3	19.5 ± 7.8 ^a	16.9 ± 11.0	23.1 ± 11.3 ^b	21.2 ± 9.0 ^b	15.4 ± 5.0 ^a
非脓毒症组	16	14.2 ± 2.9	19.4 ± 5.4	16.3 ± 8.2	17.4 ± 6.5	13.7 ± 6.1	10.7 ± 2.8	11.4 ± 6.1

注:与非脓毒症组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

