

# CD14<sup>+</sup> 单核细胞人类白细胞抗原 DR 表达率与脓毒症关系的研究

杨红明 于燕 柴家科 胡森 雷树红 张冬青 陶白江 张国安  
贺立新 姚咏明

**【摘要】 目的** 了解烧伤延迟复苏时 CD14<sup>+</sup> 单核细胞人类白细胞抗原 DR(HLA-DR) 表达率的变化, 分析其与脓毒症的关系。 **方法** 选择烧伤面积大于 30% TBSA 的 25 例烧伤延迟复苏患者, 于伤后 1、3、7、14、28 d 取外周血, 其中 7 例患者住院期间并发脓毒症, 于脓毒症发生后连续 2 d 亦取其外周血。另取 20 例健康体检者外周血作为对照。流式细胞仪检测 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率, 酶联免疫吸附测定法检测血浆中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 10 (IL-10) 的浓度。 **结果** 非脓毒症患者伤后 1、3、7、14、28 d CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率分别为 (15  $\pm$  6)%、(7  $\pm$  5)%、(26  $\pm$  17)%、(28  $\pm$  16)%、(47  $\pm$  16)%, 明显低于健康体检者 [(92  $\pm$  10)%],  $P < 0.01$ ; 脓症患者发生脓毒症后 1、2 d, 该指标亦明显低于健康体检者及非脓症患者伤后 1、7、14、28 d ( $P < 0.01$ )。脓症患者 TNF- $\alpha$  检出率及 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度, 均高于非脓症患者和健康体检者 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。伤后 1、7、28 d, 外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率与 IL-10 浓度呈显著负相关 ( $r$  分别为 -0.9963、-0.7459、-0.8474,  $P < 0.01$ )。 **结论** 烧伤延迟复苏患者免疫功能低下, 促炎性介质释放量增加, 并发脓毒症时则更为严重。外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率可作为动态检测患者免疫功能状态的有效指标。

**【关键词】** 烧伤; 脓毒症; 单核细胞; HLA-DR 抗原; 延迟复苏

**Study on the relationship between the human leucocyte antigen-DR expression on CD14<sup>+</sup> monocytes and sepsis** YANG Hong-ming, YU Yan, CHAI Jia-ke, HU Sen, LEI Shu-hong, ZHANG Dong-qing, TAO Bai-jiang, ZHANG Guo-an, HE Li-xin, YAO Yong-ming. Burn Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, P. R. China

Corresponding author: YANG Hong-ming, Email: hmyang@sohu.com, Tel: 010-66867973

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes in the expression of HLA-DR on CD14<sup>+</sup> monocytes of burn patients with delayed resuscitation, and to analyze the relationship between it and sepsis. **Methods** Twenty-five patients with total burn surface area over 30% TBSA and delayed resuscitation were enrolled in the study, among which 7 were complicated by sepsis during hospitalization. Peripheral blood was collected on 1, 3, 7, 14 and 28 post-burn days (PBD), and the blood of the patients with sepsis were also collected on the 1 and 2 days after the occurrence of sepsis. Twenty healthy volunteers were enrolled as controls. Expression rate of HLA-DR on CD14<sup>+</sup> monocytes was determined by flow cytometry. The level of TNF- $\alpha$  and IL-10 were measured by ELISA. **Results** Expression rate of HLA-DR antigen on CD14<sup>+</sup> monocytes in burn patients without sepsis on 1, 3, 7, 14, 28 PBD were (15  $\pm$  6)%, (7  $\pm$  5)%, (26  $\pm$  17)%, (28  $\pm$  16)% and (47  $\pm$  16)%, respectively, which were obviously lower than that of healthy people [(92  $\pm$  10)%],  $P < 0.01$ , and it was also markedly lower on 1 and 2 days after the occurrence of sepsis than that of controls and those of patients without sepsis on 1, 7, 14, 28 PBD ( $P < 0.01$ ). The positive rate and concentration of TNF- $\alpha$  in patients with sepsis were obviously higher than that of healthy people and patients without sepsis ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There was a negative correlation between the expression rate of HLA-DR on CD14<sup>+</sup> monocytes and IL-10 levels, and it showed significant difference on 1, 7, and 28 PBD ( $r = -0.9963, -0.7459, -0.8474$ , respectively,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Immune function is suppressed and proinflammatory mediators are excessively released in severely burn patients after delayed resuscitation, especially when complicated with sepsis. Expression of HLA-DR on CD14<sup>+</sup> monocytes may be an useful parameter for monitoring the immune function of burn patients.

基金项目:首都医学发展科研基金联合攻关项目(2003-1010)

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(杨红明、于燕、柴家科、胡森、姚咏明), 检验科(雷树红、张冬青);解放军第二炮兵总医院烧伤科(陶白江);积水潭医院烧伤科(张国安);北京右安门医院烧伤科(贺立新)

通讯作者:杨红明,Email: hmyang@sohu.com,电话:010-66867973



【Key words】 Burns; Sepsis; Monocyte; HLA-DR antigen; Delayed resuscitation

近年来的研究显示,外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞人类白细胞抗原 DR (HLA-DR) 的表达水平直接反映单核细胞的抗原呈递能力,其表达率降低可直接引起免疫效应细胞功能改变。烧伤延迟复苏可削弱患者免疫防御系统机能,增加机体对感染的易感性和脓毒症的发病率<sup>[1]</sup>。本研究中笔者通过对严重烧伤延迟复苏患者外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 进行动态监测,了解其在烧伤后的变化规律及与脓毒症的关系,同时检测肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 10 (IL-10) 浓度的变化,初步探讨相关发病机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗 HLA-DR 单克隆抗体、FITC 标记的鼠 IgG2b 同型异构体 (阴性对照)、藻红蛋白 (PE) 标记的抗人 CD14 单克隆抗体、PE 标记的鼠 IgG2a 同型异构体 (阴性对照) 均购自美国 Caltag Laboratories 公司。溶血素、白细胞固定液购自德国 Partec 公司, TNF- $\alpha$ 、IL-10 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自法国 DIACLONE 公司, cyFlow 型流式细胞仪购自德国 PARTEC 公司, 全波长多功能酶标仪购自美国 DYNEX 公司。

### 1.2 临床资料及标本采集

**1.2.1 临床资料** 选择 2006—2007 年解放军总医院第一附属医院、解放军第二炮兵总医院、北京右安门医院烧伤科收治的烧伤总面积大于 30% TBSA 的延迟复苏患者 25 例 (患者均知情同意), 其中男 24 例、女 1 例, 年龄 18~60 岁 [(32±9) 岁], 烧伤面积为 (54±25)%、其中 III~IV 度面积 (35±31)% TBSA。入院后并发脓毒症 7 例, 发生时间为伤后 (9±6) d。患者无免疫系统疾病 (如白血病等), 未曾接受化学、激素、免疫增强剂治疗。延迟复苏的标准为伤后 4 h 内未输液或 12 h 内未给予足够量的液体, 且出现血容量不足的症状和体征, 如心率 > 120 次/min、收缩压 < 90 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)、脉压 < 20 mm Hg、尿量 < 30 ml/h、口渴、表情淡漠或烦躁不安等; 脓毒症的诊断标准参照文献 [2, 3]。

**1.2.2 标本采集** 伤后 1、3、7、14、28 d 晨采集各烧伤患者静脉血 4 ml, 且并发脓毒症的患者于发生脓毒症后连续 2 d (与上述时相点不重合) 采集静

脉血 4 ml, 乙二胺四乙酸抗凝。住院期间 2 例并发脓毒症的患者死亡。另采集 20 例健康体检者静脉血各 4 ml 作为对照。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率** 取 100  $\mu$ l 静脉血加入 FITC 标记的抗 HLA-DR 单克隆抗体、PE 标记的抗人 CD14 单克隆抗体各 5  $\mu$ l, 混匀, 避光孵育 20~30 min。加入 100  $\mu$ l 白细胞固定液混匀, 避光孵育 15~20 min。加入 2 ml 溶血素混匀, 避光孵育 20~30 min。采用流式细胞仪检测, 用 2 个阴性对照设门。

**1.3.2 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度的测定** 血液标本离心后, 取血浆于 -80  $^{\circ}$ C 下冻存。测定 2 种细胞因子浓度, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。试剂盒中最小 TNF- $\alpha$  检测浓度 < 10 pg/ml、最小 IL-10 检测浓度 < 5 pg/ml。

### 1.4 统计学处理

部分数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 检验、卡方检验及相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 的表达率

健康体检者 HLA-DR 表达率明显高于非脓症患者伤后各时相点 ( $P < 0.01$ )。脓症患者发生脓毒症后连续 2 d 该指标明显低于健康体检者及非脓症患者伤后 1、7、14、28 d ( $P < 0.01$ )。见表 1, 图 1。

表 1 烧伤患者及健康体检者外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 的表达率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

受试人员	样本数	HLA-DR 表达率
非脓症患者		
伤后 1 d	6	15 ± 6 <sup>abc</sup>
伤后 3 d	22	7 ± 5 <sup>c</sup>
伤后 7 d	19	26 ± 17 <sup>abc</sup>
伤后 14 d	13	28 ± 16 <sup>abc</sup>
伤后 28 d	20	47 ± 16 <sup>abc</sup>
脓症患者		
脓毒症发生后 1 d	7	7 ± 4
脓毒症发生后 2 d	5	6 ± 4
健康体检者	20	92 ± 10 <sup>ab</sup>

注: HLA-DR 为人类白细胞抗原 DR; 与脓毒症发生后 1 d 比较, a:  $P < 0.01$ ; 与脓毒症发生后 2 d 比较, b:  $P < 0.01$ ; 与健康体检者比较, c:  $P < 0.01$

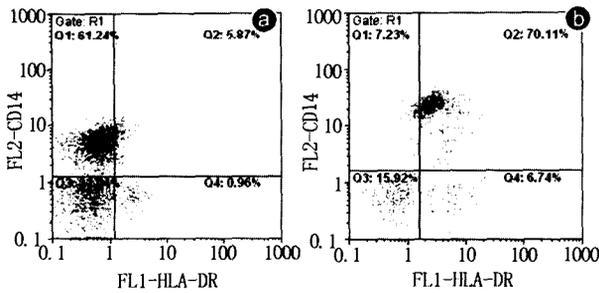


图 1 脓毒症患者与健康体检者外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞人类白细胞抗原 DR (HLA-DR) 表达情况。a. 脓毒症患者; b. 健康体检者; 左上区为 HLA-DR (-)、CD14 (+), 左下区为 HLA-DR (-)、CD14 (-), 右上区为 HLA-DR (+)、CD14 (+), 右下区为 HLA-DR (+)、CD14 (-)

### 2.2 不同标本 TNF-α 检出率及浓度

健康体检者血液标本中仅 1 例检出 TNF-α, 检出率为 5.00%, 浓度为 9.19 pg/ml。非脓毒症患者伤后各时相点 TNF-α 平均检出率和 TNF-α 浓度均高于健康体检者, 分别为 25.49%、(27 ± 25) pg/ml (P < 0.05)。脓症患者发生脓毒症后连续 2 d 的 TNF-α 平均检出率和 TNF-α 浓度均显著高于非脓症患者和健康体检者, 分别为 56.25%、(104 ± 108) pg/ml (P < 0.05 或 P < 0.01)。

### 2.3 IL-10 浓度及其与外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率的关系

非脓症患者 IL-10 浓度以伤后第 3 天最高(表 2)。伤后 1、7、28 d 外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 的表达率均与 IL-10 的浓度呈显著负相关, 回归方程分别为 Y = 28.55 - 0.48X, r = -0.9963 (P < 0.01), Y = 52.54 - 1.51X, r = -0.7459 (P < 0.01), Y = 65.56 - 2.33X, r = -0.8474 (P < 0.01), 其中 X 代表 IL-10 浓度、Y 代表 HLA-DR 表达率。

表 2 烧伤患者及健康体检者外周血 IL-10 浓度 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

受试人员	样本数	IL-10 浓度
非脓症患者		
伤后 1 d	5	19 ± 15 <sup>ace</sup>
伤后 3 d	15	36 ± 30 <sup>acf</sup>
伤后 7 d	13	16 ± 7 <sup>bef</sup>
伤后 14 d	12	16 ± 7 <sup>bef</sup>
伤后 28 d	15	7 ± 7 <sup>bd</sup>
脓症患者		
脓毒症发生后 1 d	6	72 ± 34
脓毒症发生后 2 d	7	134 ± 153
健康体检者	7	5 ± 6 <sup>bd</sup>

注: IL-10 为白细胞介素 10; 与脓毒症发生后 1 d 比较, a: P < 0.05, b: P < 0.01; 与脓毒症发生后 2 d 比较, c: P < 0.05, d: P < 0.01; 与健康体检者比较, e: P < 0.05, f: P < 0.01

### 3 讨论

既往认为, 脓毒症为感染诱发的全身炎症反应综合征, 因此学者们将治疗重点多放在抗感染和抗炎性反应方面, 但临床试验并未取得理想疗效。近年的研究提示, 创(烧)伤后机体处于炎症反应失控及免疫功能紊乱并存的状态是脓毒症发生的根本原因<sup>[4]</sup>。因此, 早期及时干预机体的免疫抑制状态成为亟待解决的问题。

CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 的表达水平直接反映单核细胞的呈递能力。Volk 等<sup>[5]</sup> 观察到, CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率 < 30% 的患者生存率降低, 其持续时间越长现象越明显, 并认为它可作为筛选脓毒症免疫抑制的标准。LeTulzo 等<sup>[6]</sup> 也证实发生脓毒症时, 早期单核细胞 HLA-DR 水平即可降低, 并与严重程度的评分、院内感染和病死率有关。免疫功能障碍时 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达降低, 其机制尚不清楚, 各家报道也不一致, 可能与伤后体内炎症介质和抗炎性介质平衡紊乱有关。但值得肯定的是, CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率在评价患者免疫功能方面简单、实用, 具有重要临床意义。

本组研究结果表明, 烧伤延迟复苏患者并发脓毒症后第 1、2 天, 外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率分别为 (7 ± 4) %、(6 ± 4) %。笔者认为, 该 HLA-DR 表达率低于 10% 时, 有助于辅助诊断脓毒症时免疫功能抑制状态, 可有效监测患者的免疫功能。未发生脓毒症患者的 HLA-DR 表达率以伤后 3 d 最低, 伤后 7、14、28 d 逐渐回升, 但仍低于健康体检者。这可能因为在伤后早期患者处于休克期, 机体免疫功能受到严重打击。经抗休克治疗后, 创面逐渐封闭, 机体免疫功能也逐渐回升。大面积烧伤后体液大量丢失, 血容量减少, 机体处于休克状态, 及时、快速补液是抗休克治疗的最主要措施。但延迟复苏患者由于休克期补液不充分, 对机体各脏器产生广泛的影响, 主要是加重抑制巨噬细胞、中性粒细胞的吞噬功能, 影响单核巨噬细胞的抗原呈递, 抑制淋巴细胞的增殖, 从而导致机体免疫抑制。

目前普遍认为促炎细胞因子如 TNF-α 浓度的高低与烧伤严重程度有关, 且与是否并发严重感染密切相关。循环中 TNF-α 的半衰期为 5 ~ 30 min, 它在血液中仅一过性出现, 检出率高低可以反映其在体内出现的频率。本研究中 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率较低的脓症患者, TNF-α 检出率和浓度均较高。由此推断, 过度释放的 TNF-α 可能影响 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 的表达。本研究结

