

· 烧伤免疫 ·

休克期切痂对烫伤大鼠外周血淋巴细胞凋亡及单核细胞抗原呈递功能的影响



刘庆阳 胡森 程爱国 邱方 浦践一 黎君友 吕艺 周国勇 盛志勇

【摘要】 目的 观察不同时相切痂对烫伤大鼠外周血淋巴细胞凋亡及单核细胞抗原呈递功能的影响。方法 将 136 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组(8 只)、单纯烫伤组(64 只)、休克期切痂组(40 只)、非休克期切痂组(24 只)。对照组不作烫伤处理;其他组均造成 30% TBSA III 度烫伤,其中后两组分别于伤后 36、120 h 行切痂植皮术。单纯烫伤组分别于伤后 6、12、24、72、120、168、216、288 h 处死;两个切痂组分别于伤后 72~288 h、168~288 h(时间间隔同上)处死,留取血液标本检测淋巴细胞凋亡率、单核细胞主要组织相容性抗原(MHC) II 类分子阳性表达率、干扰素(IFN) γ 及白细胞介素(IL)4 浓度的变化,并行相关性分析。结果 伤后 6 h 开始,单纯烫伤组淋巴细胞凋亡率迅速升高,24 h 达峰值(18.19 \pm 1.42)%,之后迅速回落,于伤后 72 h 降至低谷(8.25 \pm 0.56)%,随着时间延长又逐渐升高,288 h 时(17.81 \pm 1.99)% 接近峰值,均明显高于对照组($P < 0.05$);伤后 168~288 h 两个切痂组淋巴细胞凋亡率明显低于单纯烫伤组($P < 0.01$)。单纯烫伤组伤后 6 h 单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率急剧下降,伤后 24 h 已低于对照组[(37.2 \pm 2.4)%]的 20%,之后逐渐升高,伤后 288 h 为(18.8 \pm 2.8)%,明显低于两个切痂组($P < 0.01$)。伤后 6 h 开始,单纯烫伤组血浆 IFN- γ 浓度迅速上升,24 h 时达峰值(440.8 \pm 25.1) ng/L,之后逐渐回落,288 h 降至低谷(51.3 \pm 37.0) ng/L;而 IL-4 水平则呈线性上升,于伤后 288 h 达峰值(78.1 \pm 2.8) ng/L;伤后 72~288 h 单纯烫伤组单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率与休克期切痂组 IFN- γ /IL-4 比值呈明显的负相关($r = -0.96, P < 0.05$)。结论 大鼠烫伤后切痂能明显抑制淋巴细胞凋亡,减缓 IFN- γ /IL-4 倒置的趋势,改善单核细胞抗原呈递功能。其中在单核细胞免疫功能恢复方面,休克期切痂较非休克期切痂效果显著。

【关键词】 烧伤; 淋巴细胞; 细胞凋亡; 单核细胞; 抗原呈递; 切痂

Influence of the escharectomy during shock stage on the peripheral lymphocyte apoptosis and the antigen presentation function of monocytes in peripheral blood of scalded rats LIU Qing-yang^{*}, HU Sen, CHENG Ai-guo, QIU Fang, PU Jian-yi, LI Jun-you, LV Yi, ZHOU Guo-yong, SHENG Zhi-yong. *Burn Institute, First Affiliated Hospital to PLA General Hospital, Beijing 100037, P. R. China

Corresponding author: HU Sen, Email: hs82080@yahoo.com.cn, Tel: 010-66867397

【Abstract】 Objective To investigate the influence of escharectomy at different time-points after burn injury on the lymphocyte apoptosis and the antigen presentation function of monocytes in peripheral blood of scalded rats. Methods One hundred and thirty-six Wistar rats were randomly divided into normal control (C, n=8), scald (S, n=64, without treatment after scald), A (n=40, with escharectomy at 36 post-burn hour (PSH)), B (n=24, with escharectomy at 72 PSH) groups. The rats in A, B, S groups were inflicted with 30% TBSA full-thickness scald. The rats in S group were sacrificed on 6, 12, 24, 72, 120, 168, 216, 288 PSH, while those in A and B groups were sacrificed at 72~288 PSH, 168~288 PSH, respectively. The rats in C group were also sacrificed as control. The apoptotic rate of peripheral lymphocytes, the positive expression rate of MHC-II in mononuclear cells, the changes in concentration of IL-4 and γ -IFN were determined in each group. The correlation of above indices were also analyzed. Results (1) The apoptotic rate of peripheral lymphocyte in S group were increased dramatically at 6PSH, peaking at 24 PSH(18.19 \pm 1.42%), then decreasing gradually, reaching the lowest level at 72 PSH(8.25 \pm 0.56%), then it increased gradually again, approaching almost the peak value at 288 PSH(17.81 \pm 1.99%). The values were all obviously higher than those in C group($P < 0.05$). The apoptotic rates of peripheral lymphocyte in A and B groups were

基金项目:全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题资助项目(01L081)

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[刘庆阳(现在首都医科大学友谊医院感染暨急救医学科,100050)、胡森、黎君友、吕艺、周国勇、盛志勇];华北煤炭医学院附属医院重症监护病房(程爱国、邱方、浦践一)

通信(讯)作者:胡森, Email: hs82080@yahoo.com.cn, 电话:010-66867397

evidently lower than that in S group ($P < 0.01$). (2) The positive expression rate of MHC-II in monocyte was decreased sharply at 6 PSH, and it was 20% lower than that in C group ($37.2 \pm 2.4\%$) at 24 PSH. It then increased gradually, but it was significantly lower than that in A, B groups at 288 PSH (18.8 ± 2.8 , $P < 0.01$). (3) The plasma level of γ -IFN in S group increased gradually from 6 PSH on, peaking at 24 PSH (440.8 ± 25.1) ng/L, then decreasing gradually, and it reached the lowest level at 288 PSH (51.3 ± 37.0) ng/L. The IL-4 level in S group was increased gradually, peaking at 288 PSH (78.1 ± 2.8) ng/L. (4) There was negative correlation between the expression rate of MHC-II in S group and IL-4/ γ -IFN ratio in escharectomy groups during 72 ~ 288 PSH ($r = -0.96$, $P < 0.05$). **Conclusion** Eacharectomy after scald can inhibit peripheral lymphocyte apoptosis, slow down the inversional tendency of IL-4/ γ -IFN, and ameliorate the antigen presentation function of monocytes. Moreover, escharectomy during shock stage can markedly promote the immune function of monocytes.

【Key words】 Burns; Lymphocytes; Apoptosis; Monocytes; Antigen presentation; Escharectomy

严重烧伤后出现细胞免疫功能的紊乱,其主要原因可能是烧伤焦痂的存在。因此,最大程度地尽早去除焦痂组织能有效保护免疫细胞功能,预防烧伤后感染及脓毒症的发生。上世纪 90 年代初,笔者单位对大面积烧伤患者采用休克期切痂联合移植同种异体皮(简称异体皮)的治疗方法,取得了较好的临床疗效,但尚未明确其对机体免疫细胞功能的影响。为此,笔者采用大鼠 30% TBSA III 度烫伤模型,观察伤后不同时相点切痂对大鼠辅助性 T 淋巴细胞(Th)1 型细胞因子干扰素(IFN) γ 浓度、Th2 型细胞因子白细胞介素(IL)4 浓度、淋巴细胞凋亡率及单核细胞主要组织相容性抗原(MHC) II 类分子阳性表达率的影响,探讨不同时期切痂对机体免疫功能的影响。

材料与方 法

1. 动物分组及处理:136 只健康雄性 Wistar 大鼠(中国协和医科大学实验动物研究所),3 个月龄,体重(220 ± 10)g,腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)麻醉,背部刮毛。将其中 8 只大鼠作为对照组,处死后抽取腹主动脉血 5 ml,并立即取皮保存于含庆大霉素的等渗盐水(4℃)中待用。将余下 128 只大鼠置于 99℃ 热水中浸烫 15 s,造成背部 30% TBSA III 度烫伤^[1,2],伤后立即腹腔注射等渗盐水(15 ml/只)复苏,并随机分为单纯烫伤组 64 只,分别于伤后 6、12、24、72、120、168、216、288 h 处死;休克期切痂组 40 只,分别于伤后 72、120、168、216、288 h 处死;非休克期切痂组 24 只,分别于伤后 168、216、288 h 处死,每时相点 8 只。休克期切痂组与非休克期切痂组大鼠分别于伤后 36、120 h 行切痂+异体皮(取自对照组)移植术,并打包包扎。

2. 标本采集与处理:烫伤各组大鼠于伤后各时相点抽取腹主动脉血 5 ml,肝素钠抗凝,并分装到两支试管中:一管抗凝血置于 4℃ 下,离心半径 10

cm,3 000 r/min 离心 10 min 后,取血浆于 -20℃ 下冻存待测;另一管抗凝血与 D-Hank 溶液按 1:1 的比例稀释后缓慢加入到淋巴细胞分离液上,于 20℃ 下,离心半径 10 cm,1 500 r/min 离心 10 min 后,取中间悬雾层液体与 D-Hank 溶液按 1:4 的比例稀释,再于 4℃ 下,离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 10 min,所得的沉淀(淋巴细胞)采用 D-Hank 液冲洗 2 遍待测。对照组血液标本处理同上。

3. 检测指标:(1)淋巴细胞凋亡率的检测:将各组沉淀细胞重悬于 200 μ l 缓冲液中,加入 10 μ l Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白-异硫氰酸荧光素(FITC)和 5 μ l 碘化丙啶(PI),轻轻混匀,避光室温反应 15 min,再加入 300 μ l 结合缓冲液,1 h 内采用 FACS Calibur 四色流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)观察 20 000 个细胞并计算淋巴细胞凋亡率。(2)单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率的检测:将各组沉淀细胞重悬于 200 μ l 缓冲液中,加入 5 μ l CD11b-FITC 和免疫抗原分子-A/E-藻红蛋白 2 μ l,轻轻混匀,避光室温反应 30 min,再加入 300 μ l 缓冲液,1 h 内采用流式细胞仪观察 20 000 个细胞并计算单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率。上述荧光标记抗体均购自美国 BD-Pharmingen 公司。(3)血浆 IFN- γ 、IL-4 浓度的检测:取各组血浆标本,应用大鼠 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(法国 Dyclone 公司),严格按照说明书操作,待终止显色后应用酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)于波长 450 nm 下测定吸光度(A)值,描绘标准曲线,将各组样品 A 值代入标准曲线,计算 IFN- γ 、IL-4 浓度。(4)对上述检测指标进行相关性分析。

4. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析。

结 果

1. 伤后 24 h,单纯烫伤组大鼠外周血淋巴细胞

凋亡率最高,之后迅速下降,72 h 时降至低谷,但随着时间的延长,其值又逐渐升高,均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。伤后 168、216、288 h,休克期切痂组与非休克期切痂组均显著低于单纯烫伤组 ($P < 0.01$);休克期切痂组与非休克期切痂组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2. 伤后 24 h,单纯烫伤组大鼠外周血单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率低于对照组值的 20%,之后逐渐回升,但 288 h 时仍明显低于对照组 ($P < 0.05$);伤后 288 h,两切痂组该值均高于单纯烫伤组 ($P < 0.01$),其中休克期切痂组高于非休克期切痂组 ($P < 0.01$)。见表 2。

3. 伤后 6 h 起,单纯烫伤组大鼠血浆 IFN- γ 浓度逐渐升高,24 h 时达峰值,其后逐渐回落,288 h 时降至最低,但仍高于对照组 ($P < 0.05$);伤后 168、216、288 h,休克期切痂组、非休克期切痂组均显著高于单纯烫伤组 ($P < 0.01$),其中前者显著高于后者 ($P < 0.05$)。见表 3。

4. 伤后 6 h 起,单纯烫伤组大鼠血浆 IL-4 浓度呈线性上升,288 h 达峰值,均高于对照组 ($P < 0.05$);伤后 168、216、288 h,休克期切痂组与非休克期切痂组均显著低于单纯烫伤组 ($P < 0.01$),其中前者又显著低于后者 ($P < 0.05$)。见表 4。

5. 伤后 72 ~ 288 h,单纯烫伤组单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率与休克期切痂组 IFN- γ /IL-4 的比值呈明显负相关 ($r = -0.96, P < 0.05$)。直线回归方程: $Y = 31.553 - 6.490X$,其中 Y 为 MHC-II 类分子阳性表达率, X 为 IFN- γ /IL-4 比值。

讨 论

有研究表明,皮肤烧伤后可发生聚合反应,产生以脂蛋白复合物(LPC)为主的、有毒性的多聚体烧伤毒素,对体液免疫和细胞免疫功能均有明显的抑制作用^[3]。但造成全身免疫功能紊乱的机制仍未完全阐明,国内外学者报道,在免疫功能紊乱的发生与发展过程中,淋巴细胞凋亡不仅表现为一种病理

表 1 不同时相点下切痂对烫伤大鼠外周血淋巴细胞凋亡率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)							
		6	12	24	72	120	168	216	288
单纯烫伤组	64	13.74 ± 0.93*	15.16 ± 0.64*	18.19 ± 1.42*	8.25 ± 0.56*	9.98 ± 0.42*	11.71 ± 1.02*	13.16 ± 0.98*	17.81 ± 1.99*
休克期切痂组	40	—	—	—	10.51 ± 0.34	9.20 ± 0.60	8.74 ± 0.47*	11.59 ± 0.96*	15.00 ± 0.90*
非休克期切痂组	24	—	—	—	—	—	10.80 ± 0.23*	10.36 ± 0.41*	13.26 ± 1.29*

注:“—”表示无此项;对照组 8 只大鼠,外周血淋巴细胞凋亡率为(4.35 ± 0.44)%;与对照组比较,* $P < 0.05$;与单纯烫伤组比较,# $P < 0.01$

表 2 不同时相点下切痂对烫伤大鼠外周血单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)							
		6	12	24	72	120	168	216	288
单纯烫伤组	64	18.5 ± 1.3*	9.1 ± 2.0*	4.3 ± 2.1*	8.3 ± 2.4*	9.6 ± 3.0*	11.8 ± 1.7*	13.4 ± 2.6*	18.8 ± 2.8*
休克期切痂组	40	—	—	—	5.8 ± 1.3	10.2 ± 2.7	11.1 ± 3.1*	20.3 ± 1.3*	30.5 ± 7.2*
非休克期切痂组	24	—	—	—	—	—	8.6 ± 1.8*	11.0 ± 1.6*	23.6 ± 4.0* ^Δ

注:“—”表示无此项;对照组 8 只大鼠,外周血单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率为(37.2 ± 2.4)%;与对照组比较,* $P < 0.05$;与单纯烫伤组比较,# $P < 0.01$;与休克期切痂组比较,Δ $P < 0.01$

表 3 不同时相点下切痂对烫伤大鼠血浆 IFN- γ 浓度的影响(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)							
		6	12	24	72	120	168	216	288
单纯烫伤组	64	147.5 ± 13.5*	340.6 ± 16.5*	440.8 ± 25.1*	202.7 ± 26.6*	167.7 ± 20.5*	140.0 ± 8.7*	90.0 ± 12.4*	51.3 ± 37.0*
休克期切痂组	40	—	—	—	192.8 ± 10.0	174.4 ± 13.9	168.4 ± 8.8*	155.5 ± 20.3*	131.8 ± 4.6*
非休克期切痂组	24	—	—	—	—	—	152.7 ± 3.6* ^Δ	130.0 ± 10.4* ^Δ	117.3 ± 5.2* ^Δ

注:“—”表示无此项;对照组 8 只大鼠,血浆 IFN- γ 浓度为(28.9 ± 2.9)ng/L;与对照组比较,* $P < 0.05$;与单纯烫伤组比较,# $P < 0.01$;与休克期切痂组比较,Δ $P < 0.05$

表 4 不同时相点下切痂对烫伤大鼠血浆 IL-4 浓度的影响(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)							
		6	12	24	72	120	168	216	288
单纯烫伤组	64	20.3 ± 0.6*	26.4 ± 2.0*	33.4 ± 2.2*	47.0 ± 3.1*	50.5 ± 2.8*	53.8 ± 9.5*	63.1 ± 4.0*	78.1 ± 2.8*
休克期切痂组	40	—	—	—	39.0 ± 1.9	44.8 ± 3.8	44.6 ± 3.4*	50.0 ± 2.9*	51.6 ± 2.1*
非休克期切痂组	24	—	—	—	—	—	51.8 ± 3.1* ^Δ	57.9 ± 1.8* ^Δ	62.0 ± 8.5* ^Δ

注:“—”表示无此项;对照组 8 只大鼠,血浆 IL-4 浓度为 0 ng/L;与对照组比较,* $P < 0.05$;与单纯烫伤组比较,# $P < 0.01$;与休克期切痂组比较,Δ $P < 0.05$

现象,同时也是诱导免疫抑制的重要原因^[4]。由于发生凋亡的主要是 B 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞和树突状细胞,从而造成抗体的产生减少、单核细胞活化及抗原呈递能力下降,但 CD8⁺T 淋巴细胞、自然杀伤细胞数量并不减少。

基于以上认识和免疫学的进展,本研究采用大鼠 30% TBSA III 度烫伤模型,动态检测了外周血淋巴细胞凋亡率、单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率以及血浆 IFN- γ 、IL-4 浓度的变化。结果显示:单纯烫伤组大鼠外周血淋巴细胞凋亡率于伤后 72 h 起逐渐回升;单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率在伤后早期急剧下降,之后逐渐恢复,但伤后 288 h 仍约为对照组的 50%;致伤 24 h 后 IFN- γ 浓度逐渐下降,IL-4 浓度呈进行性升高,二者比例接近,于伤后 288 h 时出现 IFN- γ /IL-4 比例 < 1 (倒置)。由此提示,随着淋巴细胞(主要是 CD4⁺T 淋巴细胞)凋亡率逐渐升高^[5],一方面,Th1 型细胞因子分泌减少,造成单核细胞激活能力下降,导致其表面抗原呈递功能的降低;另一方面,CD8⁺T 淋巴细胞相对增加,通过体内外因素的刺激,Th2 型细胞因子分泌增加,使促炎性反应随着时间的延长逐渐过度到抑炎性反应,炎性因子网络紊乱,最终出现 Th1/Th2 细胞因子比值倒置,致单纯烫伤组大鼠免疫细胞功能严重障碍。

烧伤后休克期切痂植皮的根本目的在于尽早、最大程度地清除创面,终止 LPC 对机体的持续作用,防止免疫功能紊乱的发生,降低创面脓毒症和感染发生率^[6]。烧伤组织的存在决定了血管通透性增加、血浆成分外渗、血容量减少。烧伤创面的痂下水肿液可抑制细胞免疫调节功能,将此液注入健康人淋巴细胞培养液中,完全抑制了淋巴细胞的增生。因此,在急性渗出高峰阶段的休克期进行深度创面切痂,可从根本上或大部分阻断渗出途径,减少体液丧失,减轻微循环障碍,从而减轻早期氧自由基的损伤作用,有利于烫伤大鼠外周血淋巴细胞功能的恢复^[7,8]。

鉴于此,笔者单位将休克期切痂植皮作为保护免疫细胞功能的有效措施应用于临床中,并分析了大面积烧伤患者 T 淋巴细胞亚群的动态变化规律,观察到伤后 T 淋巴细胞总数(CD3⁺)、CD4⁺T 淋巴

细胞均显著减少,CD8⁺T 淋巴细胞增多,CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞之比亦随之降低。休克期切痂组患者于 24 h 左右切除了大部分深度创面及皮下组织,较早地去除了影响细胞免疫功能的不利因素,有利于细胞亚群的功能恢复;术后 3、7、14、21 d 检测 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞数量及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值,均高于非休克期切痂组,而 CD8⁺T 淋巴细胞比非休克期切痂组低^[9]。

本次实验研究进一步证实,严重烧伤后实施休克期切痂能明显改善大鼠的免疫功能,效果明显优于非休克期切痂。它可明显遏制淋巴细胞凋亡率的升高,减缓 Th1 和 Th2 型细胞因子比例失调的趋势,促进单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率的恢复。根本原因可能在于休克期切痂能有效缓解烫伤后早期淋巴细胞的大量凋亡,既加快了单核细胞抗原呈递功能的恢复,又减缓了 T 淋巴细胞的功能性极化;相关性分析结果亦提示,单纯烫伤组大鼠单核细胞 MHC-II 类分子阳性表达率恢复的趋势与休克期切痂组 IFN- γ /IL-4 比值降低的趋势呈明显负相关。故而休克期切痂植皮作为早期干预治疗烧伤患者免疫功能障碍的措施之一,能很好地限制烫伤大鼠免疫细胞所遭受的损害,促进其功能的恢复。

参 考 文 献

- 1 郝岱峰,郭振荣,柴家科,等. 内毒素/脂多糖对烫伤大鼠休克期肝脏脂肪代谢的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21: 333-335.
- 2 贺立新,郭振荣,吕艺,等. 休克期切痂对大鼠肺组织 ICAM-1、TNF- α mRNA 表达的影响. 中华烧伤杂志, 2000, 16: 30-33.
- 3 Schoenenberger GA. Burn toxins isolated from mouse and human skin. Their characterization and immunotherapy effects. *Monogr Allergy*, 1975, 9: 72-139.
- 4 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003, 348:138-150.
- 5 董宁,姚咏明,董月青,等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖及凋亡影响. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 393-396.
- 6 王忠堂,姚咏明,盛志勇,等. 休克期切痂对烫伤大鼠全身和肠道局部免疫功能的影响. 中华烧伤杂志, 2004, 20:330-332.
- 7 刘庆阳,胡森,邱方,等. 休克期切痂植皮对大鼠淋巴细胞凋亡率的影响. 感染、炎症、修复, 2005, 6: 157-158.
- 8 闫柏刚,黄跃生,杨宗城,等. 立即与延迟切痂对烫伤大鼠若干炎症介质变化的影响. 第三军医大学学报, 2001, 23:39-41.
- 9 盛志勇,郭振荣,主编. 危重烧伤治疗与康复学. 北京:科学出版社, 2000. 180-181.

(收稿日期:2005-12-27)

(本文编辑:莫愚)