

脆弱类杆菌脂多糖对正常人外周血单个核细胞分泌白细胞介素的影响

周捷 黄晓元 任利成 唐寅

【摘要】 目的 通过研究脆弱类杆菌脂多糖(LPS)对正常人外周血单个核细胞(PBMC)分泌白细胞介素 2(IL-2)和白细胞介 4 素(IL-4)的影响,探讨脆弱类杆菌感染的机制。 **方法** 采用脆弱类杆菌临床分离菌和标准菌株(NCTC9343)提取的 LPS,以不同浓度作用于 PBMC,24 h 后收集培养细胞上清,运用 ELISA 法检测其 IL-2 和 IL-4 的含量变化。 **结果** 脆弱类杆菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 有显著抑制作用,并呈明显的浓度依赖关系($r = 0.8024, P < 0.01$)。脆弱类杆菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-4 有显著刺激作用($P < 0.05$),但无浓度依赖关系。脆弱类杆菌临床分离菌与标准菌株 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 和 IL-4 具有相同效应,两组之间无明显差异($r = 0.1095, P > 0.05$)。 **结论** 脆弱类杆菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 有抑制作用,而对 IL-4 的分泌有刺激作用。

【关键词】 脆弱类杆菌; 脂多糖; 单个核细胞; 白细胞介素 2; 白细胞介素 4; 免疫抑制

The influence of the LPS from bacteroides fragilis on the secretion of IL-2 and IL-4 from the peripheral blood mononuclear cells of normal volunteers ZHOU Jie, HUANG Xiao-yuan, REN Li-cheng, TANG-yin, et al. Department of Burns and Plastic Surgery, Xiangya Hospital, Central South University Changsha, 410008, Hunan Province, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of the LPS of Bacteroides fragilis on the secretion of IL-2 and IL-4 from the peripheral blood mononuclear cells of normal individuals, so as to elucidate the mechanism of the infection by Bacteroides fragilis. **Methods** LPS was obtained from both the strains isolated from patients and from standard NCTC9343. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were treated with different concentrations of LPS thus obtained. The supernatants from the cell culture of the PBMCs were harvested at 24 PBHs and were subjected to the determination of the IL-2 and IL-4 contents by ELISA method. **Results** The IL-2 secretion from the PBMCs of normal volunteers was obviously inhibited by the LPS from Bacteroides fragilis ($P < 0.01$), and the inhibitory effect was dose-dependent. Nevertheless, the IL-4 secretion from the PBMCs of normal volunteers was significantly stimulated by the LPS from Bacteroides Fragilis ($P < 0.05$), and it was not concentration dependent. There was no difference between the effects of the LPSs from patients and standard strains ($P < 0.05$). **Conclusion** The LPS from Bacteroides fragilis was inhibitory to the secretion of IL-2 from PBMCs and was stimulative to that of IL-4 from PBMCs of normal human persons.

【Key words】 Bacteroides Fragilis; LPS; PBMC; IL-2; IL-4; Immune suppression

感染是严重烧伤患者主要并发症和死亡原因。厌氧菌在烧伤感染中起重要作用。脂多糖(LPS)是脆弱类杆菌外膜重要组成成分及主要致病物质。目前关于 LPS 介导的感染后免疫抑制机制的研究均限于大肠杆菌的 LPS,而作为烧伤患者临床标本检出率最高的厌氧菌之一的脆弱类杆菌 LPS,对机体免疫细胞影响尚未见文献报道。本研究通过研究脆弱类杆菌 LPS 对人外周血单个核细胞(PBMC)分泌白细胞介素 2(IL-2)和白细胞介素 4(IL-4)的影响,探讨脆弱类杆菌 LPS 对机体免疫细胞的作用,有助

于为临床上进一步防治厌氧菌感染提供理论基础。

材料与 方法

一、主要试剂与仪器

1 640 培养基:美国 Gibco 公司;淋巴细胞分离液:上海恒信化学试剂公司;IL-2/4 ELISA 成套试剂盒:深圳晶美生物试剂公司;鲎试剂成套试剂盒:上海生化试剂二厂。美国 Beckman Avanti 30 低温高速离心机;美国 Spectronic 501 半自动生化分析仪;美国 Savant Uvs 400A 真空干燥仪;日本 OLYMPUS IX70 倒置显微镜;美国 Queue CO₂ 培养箱;日本 SANYO 超低温冰箱。

二、菌种来源

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970754)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院烧伤整形外科

脆弱类杆菌临床分离菌:采自湘雅医院烧伤科病房烧伤患者;脆弱类杆菌标准菌株 NCTC9343:美国 ATCC 公司提供。

三、实验分组与指标检测

1. 分组:从 12 个正常成人外周静脉血中分离 PBMC。提取纯化后的脆弱类杆菌临床分离菌和标准菌株(NCTC9343)LPS 为处理因素,分为 3 组,分别为空白对照组、脆弱类杆菌临床分离菌 LPS 处理组和脆弱类杆菌标准菌株 LPS 处理组(阳性对照组)。其中 LPS 处理组按浓度分为 10、1、0.1、0.01 EU/ml 4 个剂量。

2. 脆弱类杆菌的分离培养和鉴定:脆弱类杆菌临床分离菌,分离于本院烧伤科病房烧伤患者的痂下分泌物或焦痂。标本床旁接种于已预还原的厌氧增菌培养基,试管法送检,置于厌氧培养箱,36℃,48 h。通过观察菌落形态、革兰染色及生化反应鉴定,证实为脆弱类杆菌。

3. 脆弱类杆菌 LPS 的提取纯化与检测:采用 PCP 法^[1]提取 LPS 后,上清液经滤纸过滤。去除石油醚和氯仿(真空干燥仪,30~40℃ 30 min)后,滴入双蒸水,直到内毒素出现沉淀为止。沉淀内毒素,600 × g 离心 10 min,去除上清。沉淀物用 5 ml 体积分数 80% 苯酚洗 2 次,去除上清。最后沉淀物用丙酮洗 2 次。真空干燥,将内毒素溶于蒸馏水。纯化:超速离心,100 000 × g,共 4 h。重新溶解后,冰冻干燥保存于 -20℃。检测:采用鲎试验(LT Limulus Test)检测纯化后的 LPS 的浓度。

4. PBMC 的分离培养与处理:静脉穿刺抽取正常成人外周静脉血 4 ml 于肝素抗凝管,加入 Hanks 液洗涤后,缓慢加入放置有 2 ml 淋巴细胞分离液的试管中,低速离心 25 min。用毛细吸管吸取中层的淋巴细胞于另一支试管中,,加入 Hanks 液吹打洗涤后 2 000 × g 离心 8 min。洗涤 3 次后,加入 1 ml 1 640 完全培养基混匀。调整细胞浓度为 1 × 10⁶/孔,接种于 24 孔培养板。分组处理:空白对照组仅加入 PHA 20 μl/孔(浓度为 1 μg/μl);LPS 处理组:加入 PHA 20 μl/孔,同时加入不同浓度的 LPS 20 μl/孔,置入 CO₂ 培养箱。24 h 后收集细胞上清于 Eppendorf 管,冻存于 -70℃ 冰箱备用。

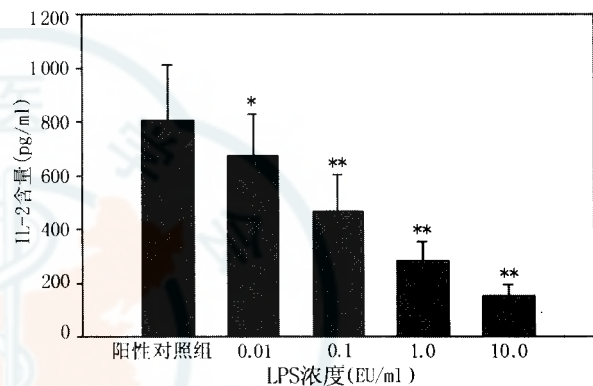
5. IL-2、IL-4 的测定:用 ELISA 方法检测。

四、统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 统计软件包进行方差分析和相关分析。

结 果

1. LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 的影响:脆弱类杆菌 LPS 可导致正常人 PBMC 分泌 IL-2 下降($P < 0.01$)。10 EU/ml、1 EU/ml 及 0.1EU/ml 浓度组与对照组相比,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),0.01 EU/ml 浓度组与对照组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图 1。脆弱类杆菌 LPS 抑制正常人 PBMC 的 IL-2 分泌,表现出浓度依赖关系(相关系数: $r = 0.8024, P < 0.01$)。

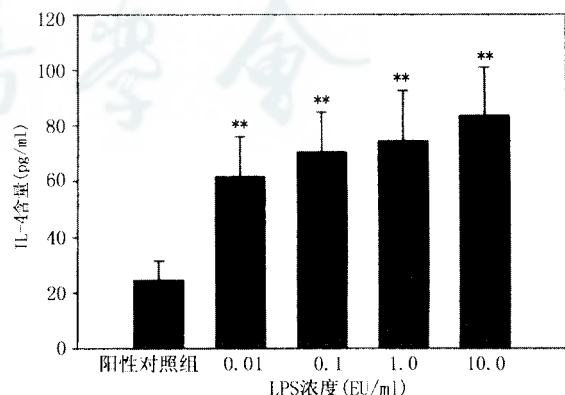


注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 脆弱类杆菌临床分离菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 的影响

Fig 1 The effects of Bacteroid Fragilis originated LPS on the IL-2 secretion from PBMC in healthy people

2. LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-4 的影响:脆弱类杆菌 LPS 可以诱导正常人 PBMC 分泌 IL-4($P < 0.01$)。但在各浓度组之间无显著差异,见图 2。脆弱类杆菌 LPS 诱导正常人 PBMC 分泌 IL-4 无明显浓度依赖关系(相关系数: $r = 0.1095, P > 0.05$)。



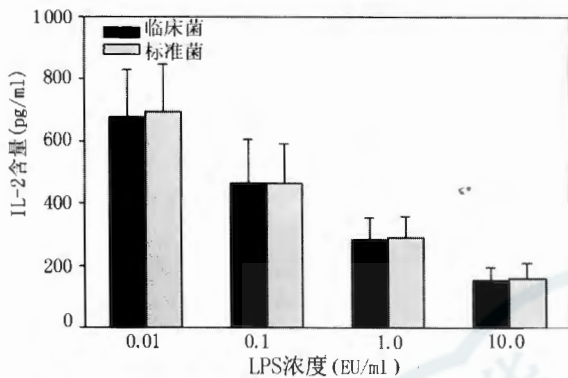
注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

图 2 脆弱类杆菌临床分离菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-4 的影响

Fig 2 The effects of Bacteroid Fragilis originated LPS on the IL-4 secretion from PBMC in healthy people

3. 脆弱类杆菌临床分离菌与脆弱类杆菌标准菌株 LPS 对正常人 PBMC 分泌的 IL-2 及 IL-4 影响:比较本实验研究,以脆弱类杆菌标准菌株 NCTC9343 的

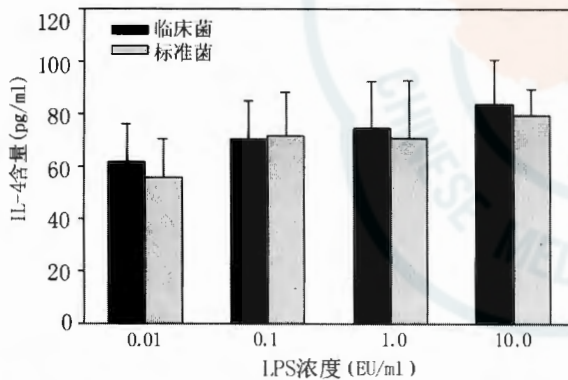
LPS 作为阳性对照,显示脆弱类杆菌临床分离菌与脆弱类杆菌标准菌株 NCTC9343 的 LPS 对正常人 PBMCIL-2 及 IL-4 的分泌具有相同效应,两组之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$),见图 3、4。



注:两组间比较, $P > 0.05$

图 3 脆弱类杆菌临床菌和标准菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 的影响

Fig 3 The effects of LPS from patients and standard and clinical isolated *Bacteroid fragilis* on the IL-2 secretion from PBMC healthy people



注:两组间比较, $P > 0.05$

图 4 脆弱类杆菌临床菌和标准菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-4 的影响

Fig 4 The effects of LPS from patients and standard and clinical isolated *Bacteroid fragilis* on the IL-4 secretion from PBMC healthy people

讨 论

LPS 多存在于 G⁻ 细菌外膜中,是 G⁻ 细菌主要致病物质之一。严重感染中,LPS 通过下调炎症因子如 IL-2,上调抗炎性因子如 TGF-β、IL-4、IL-10 以及其他内源性介质如 PGE₂、糖皮质激素、NO 等,抑制机体免疫。有一些学者则认为 LPS 可诱导淋巴细胞、单核-巨噬细胞等免疫细胞的凋亡,从而抑制了免疫细胞的功能。严重感染时,机体免疫由 Th1 向 Th2 转换(Th1/Th2 Shift)是造成感染后机体免疫抑制的另一个重要原因,其机制未明。Song 等^[2]指出,LPS 等介质可激活应急诱导有丝分裂原激活的蛋白激酶家族(Mitogen-activated Protein Ki-

nases, MAPKs),如 JNK、ERK 和 p38 MAPK 等,导致了 Th1 向 Th2 转换,从而介导了机体免疫抑制。

本实验显示,脆弱类杆菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 有显著抑制作用 ($P < 0.05$),不同浓度 LPS 之间表现出浓度依赖关系。而脆弱类杆菌 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-4 有显著刺激作用 ($P < 0.05$),但不同浓度 LPS 之间无明显差异,不表现为浓度依赖关系。实验结果说明,正常人 PBMC 释放 IL-2 的能力下降与脆弱类杆菌 LPS 有直接关系,而 IL-4 分泌的增加可能是 LPS 间接作用所致。这与 Ayala 等^[3]人对脓毒症患者的实验观察结果相吻合,由此提出在脓毒症后期,IL-2 和 IFN-γ 释放能力下降与抗炎性介质 IL-4 和 IL-10 增高有关。IL-2 主要由 Th1 细胞产生,是一种典型的 Th1 因子。本研究采用 LPS 作用于 PHA 刺激后的正常人 PBMC,结果 LPS 对正常人 PBMC 分泌 IL-2 有显著抑制作用,说明脆弱类杆菌 LPS 对正常人淋巴细胞、尤其是 Th1 细胞有抑制作用,从而抑制了机体免疫功能。这与 Fanny 等^[4]人用 LPS 对正常人的体内实验观察结果吻合。IL-4 主要由活化 T 细胞(Th2 细胞)产生,是最典型的 Th2 因子。作为一种免疫抑制因子,众多学者观察到严重感染后,IL-4 与 TGF-β、IL-10、PGE₂ 及糖皮质激素等内源性介质持续增高。Song 等^[5]人在脓毒症动物模型中观察到,IL-4 可以通过激活淋巴细胞信号传导子(Signal Transducer)及转录因子-6(Stat-6)旁路,调整 Th1 和 Th2 细胞的反应性。进一步予以 IL-4 单抗,可通过阻断 Stat-6 蛋白的磷酸化,恢复 Th1 细胞的反应性,刺激 Th1 因子的释放,降低 Th2 细胞因子的释放。

脆弱类杆菌临床分离菌 LPS 与脆弱类杆菌标准菌株 NCTC9343 LPS,对正常人 PBMC 具有相同效应,两组之间无明显差异。说明作为 LPS“毒力中心”的类脂 A 是 LPS 结构中最保守部分,在脆弱类杆菌临床分离菌 LPS 与脆弱类杆菌标准菌株 NCTC9343 LPS 中变异很小,而类脂 A 具有完整 LPS 的大部分毒性作用和生物学活性。

综上所述,LPS 通过介导炎症介质的异常释放,诱导机体免疫应答 Th1/Th2 转换,直接或间接作用于机体免疫系统,介导了感染后的免疫抑制。因此,阻断 LPS 及其信号传导以及 LPS 产物,逐渐成为脓毒症治疗的一个崭新的途径。

参 考 文 献

1 焦炳华,主编.分子内毒素学.上海:上海科学技术文献出版社,1995.352-353.

2 Song GY, Chung CS, Chaudry IH, et al. Immune suppression in polymicrobial sepsis: differential regulation of Th1 and Th2 responses by p53 MAPK. *J Surg Res*, 2000, 91:141-146.

3 Ayala A, Deol ZK, Lehman DL, et al. Polymicrobial sepsis but not low dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL-4/IL-10 production. *J Surg Res*, 1994, 56: 579-585.

4 Fanny NL, Tessa TH, Pascale EP, et al. Reduced Th1, but not Th2, Cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy

subjects to endotoxin. *Infect Immun*, 2000, 68:1014-1018.

5 Song GY, Chung CS, Chaudry IH, et al. IL-4-induced activation of the Stat-6 pathway contributes to suppression of cell-mediated immunity and death in sepsis. *Surgery*, 2000, 128:133-138.

(收稿日期:2001-12-11)
(本文编辑:赵云)

· 经验交流 ·

烧伤并发筋膜室综合征临床分析

梁达荣 李孝建 刘锡麟

烧伤后并发筋膜室综合征(compartment syndrome)国内报道不多,一旦发生,则后果严重。近几年笔者单位救治 8 例此类患者,现报告如下:

临床资料:1993 年 1 月~2000 年 12 月收治烧伤住院患者 4 650 例,其中 8 例并发筋膜室综合征。其性别、年龄、入院诊断、发生时间、发生部位以及治疗手段和结果见下表。

表 1 8 例烧伤后并发筋膜室综合征患者一般情况

例号	性别	年龄	烧伤总面积 / III度(%)	伤后发生时间(d)	发生部位	治疗手段	结果
1	男	32	93/75	5	双小腿	截肢术	治愈
2	男	1.5	6/6	5	右前臂	清创植皮	治愈
3	男	29	3/3	4	左前臂	截肢术	治愈
4	男	44	20/5	8	右前臂	清创植皮	治愈
5	男	41	96/53	20	右手	清创术	治愈
6	男	38	85/62	5	双小腿	清创植皮	治愈
7	男	45	60/45	6	双小腿	清创植皮	治愈
8	男	6	35/35	5	右小腿	清创植皮	治愈

临床症状与体征:8 例患者发生筋膜室综合征后均有全身炎症反应综合征(SIRS)表现,以体温高于 39℃,白细胞 > 12 × 10⁹/L 为主。局部组织肿胀、发硬,肢体远端皮肤发绀或皮温变冷(皮肤烧伤除外)。患肢感觉疼痛,麻木,但例 1、5、6、7 检查此症不明显,也许与这 4 例患者烧伤面积大、疼痛部位难以分清有关。例 4 伤后第 8 天行右上肢切痂植皮术,术后当天晚上诉局部包扎伤口胀痛难忍,松懈敷料后症状缓解,但见局部组织肿胀、瘀血及失活迹象。所有病例都作了创面分泌物细菌培养,结果全部阴性,可能系创面外敷磺胺嘧啶银霜抑制细菌生长。

讨论 本组 8 例筋膜室综合征发生部位:4 例小腿,3 例前臂,1 例手。从解剖位置分析,大腿和上臂的筋膜较薄,富有弹性,且较松弛;而小腿和前臂的筋膜厚韧,缺乏弹性,且均有双骨和骨间膜,使筋膜室的容积难以增加,故小腿和前臂较大腿和上臂易发生筋膜室综合征。本组 8 例,其中 7 例就发生在小腿和前臂,值得注意。

筋膜室综合征是筋膜室内的肌肉和神经因急性缺血而发生的一系列症状和体征,临床上多见于创伤和挤压伤,少见于烧伤。据文献报道^[1,2],烧伤后发生筋膜室综合征主要

是由于烧伤局部的毛细血管损伤和广泛的血管反应,使筋膜室内的肌肉发生水肿,再加上深度烧伤形成焦痂后缺乏弹性,水肿压力得不到缓解导致肌肉缺血坏死。预防的有效办法是对深度环形烧伤的肢体尽早切开减压。本组 8 例有 6 例是早期预防措施不力所致,其原因:(1)对深度烧伤的肢体没有及时切开减压;(2)切开减压不充分;(3)对皮肤烧伤程度判断不准确,将 III 度创面误认为 II 度创面;(4)对皮肤受伤缺乏动态观察,由于浅度烧伤创面可以转变为深度烧伤,当局部水肿尚未消退之前皮肤已呈硬壳样改变裹紧组织,这时仍不作切开减压术很容易引起并发此症。(5)术后包扎过紧或压力不均匀。

肢体筋膜室综合征的处理是一件非常棘手的事,尤其是大面积烧伤患者合并这一症状时,为了挽救生命抢得先机而多需作截肢处理。笔者通过临床观察,除 1 例手部筋膜室综合征呈局灶性肌肉坏死外,其余 7 例局部均表现为靠主动脉脉供给营养的肌肉有活力,其分支因血栓造成肌肉坏死,要保存肢体只有保护好主干的动静脉,使其周围发生肉芽,最后植皮消灭创面。这一过程难度很大。

笔者的经验:(1)积极多次行扩创术。手术时在明视下尽可能将坏死组织清除,但以不出血为宜;(2)创面分别用 3% 双氧水和等渗盐水进行冲洗,然后外喷重组牛碱性成纤维细胞生长因子(贝复剂),外涂磺胺嘧啶银霜,每天 1 次;(3)争取早日消灭体表创面,集中精力处理深部坏死组织;(4)每周做 1 次创面培养+药敏试验;(5)肌肉注射破风抗毒素 1 500 U 1 次/2 周,预防破伤风的发生;(6)加强全身抗感染及营养支持;(7)注意保护肝肾功能,防止内脏损伤。6 例患者虽然通过上述措施保存了肢体,但是仅起到一种支架和外形的作用,缺乏应有的功能。为此,笔者认为治疗筋膜室综合征最重要的仍是预防。

参 考 文 献

1 Brown BL, Greenhalgh DG, Kagan RJ, et al. The adequacy of limb escharotomies-fasciotomies after referral to a major burn center. *J Trauma*, 1994, 37:916-920.

2 卢长虹,苏晓利.严重烧伤后骨筋膜室综合征一例. *中华烧伤杂志*, 2001, 17:12.

(收稿日期:2001-10-15)
(本文编辑:赵云)

作者单位:510220 广州市红十字会医院烧伤科