

# 严重多发伤患者外周血树突状细胞的变化

白祥军 唐朝晖 邹声泉

**【摘要】目的** 探讨严重多发伤后患者早期外周血树突状细胞 (DC) 的变化。**方法** 自严重多发伤患者 (24 例, 多发伤组) 和健康人 (13 例, 对照组) 外周血分离出树突状细胞; 通过流式细胞仪检测各组的 DC 数量 (CMRF-44 标记法) 及 DC 表面 HLA-DR、CD80、CD86 表达水平以及 DC 诱导的 T 细胞反应性增殖。**结果** 多发伤组 DC 数量 [  $(7.3 \pm 3.4) \times 10^6/L$  ] 明显低于对照组 DC 数量 [  $(14.1 \pm 5.3) \times 10^6/L$  ],  $P < 0.01$ 。多发伤组 DC 表面 HLA-DR 及 CD80、CD86 的表达水平与对照组相比明显下调 ( $P < 0.01$ )。DC 诱导的 T 细胞增殖能力多发伤组明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。**结论** 严重多发伤患者早期外周血 DC 数量少, 功能低下, 与创伤早期免疫功能低下有关。

**【关键词】** 多发伤; 树突状细胞; 免疫学

**The variation of peripheral blood dendritic cell in patients with severe multiple trauma** BAI Xiangjun, TANG Zhaohui, ZOU Shengquan. Emergency Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**【Abstract】Objective** To explore the relation of the character of dendritic cell (DC) variation in patients with severe multiple trauma. **Methods** DC were purified from peripheral blood of health volunteers (control group, 13 cases) and trauma patients (trauma group, 24 cases). The number of DC and the expression levels of HLA-DR and CD80, CD86 on DC were detected by CMRF-44 mAb labelling and flow cytometer. The capacity of DCs to induce the proliferation of T cell was tested in a mixed leukocyte reaction (MLR). **Results** The DC counts in trauma group [  $(7.3 \pm 3.4) \times 10^6/L$  ] were obviously lower than in control groups [  $(14.1 \pm 5.3) \times 10^6/L$  ] ( $P < 0.01$ ). The expression level of HLA-DR and CD80, CD86 of DC on trauma group were obviously downregulated than in control group ( $P < 0.01$ ). The proliferation of T cell induced by DC were obviously reduced in trauma group than in control group. **Conclusion** The number is little and the function is inadequate in peripheral blood DC of patients with severe multiple trauma. The character of alterations in DC may be closely correlated with immunosuppression after severe multiple trauma.

**【Key words】** Multiple trauma; Dendritic cell; Immunology

树突状细胞 (DC) 是体内专职抗原提呈细胞 (APC), 具有摄取和加工抗原, 并分泌多种细胞因子的功能, 在激发 T 细胞的免疫应答中居中心地位。本文在我们原来工作的基础上重点观察了严重多发伤 (ISS 25 分) 患者外周血 DC 的变化, 探讨其与严重多发伤后免疫功能变化的关系<sup>[1]</sup>。

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院急救中心

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

1.1.1 严重多发伤组 随机选择本院 2003 年 1 月至 10 月间收治的既往健康的严重多发伤患者 24 例, 男 17 例, 女 7 例; 年龄 18~56 岁, 平均 (31 ± 13) 岁, 此次损伤程度评分 (ISS) 29~54 分, 平均 (34.3 ± 12.4) 分, 于伤后 24 h 内采集外周血 15 ml, 肝素抗凝备用。

1.1.2 对照组 健康志愿者 13 例, 男 9 例, 女 4 例; 年龄 17~50 岁, 平均年龄 (38 ± 7) 岁。

### 1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 Ficoll-Hypaque 分层液

(三叶生物技术公司); 鼠抗人的单克隆抗体 HLA-DR (异硫氰酸荧光素标记, FITC), CD80、CD86、(藻红蛋白标记, PE) (Pharmingen 公司, 美国); CMRF44mAb (IgM), PE-CD14 (IgG2b)、PE-CD19 (IgG1) 由杨想平博士 (生化系, RWTH 大学, 德国) 惠赠。流式细胞仪 (FCM, BD 公司)。

1.2.2 DC 的分离与纯化 取外周血, 首先通过全自动血细胞分析仪测定单核细胞数, 然后用 Ficoll-Hypaque 分层法及表面吸附法分离单核细胞, 收集单个核细胞悬浮于 RPMI1640 中, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。将分离出的单个核细胞, 用 E 花环试验分层法分离出 T 细胞, Ig 包被黏附法、牛血清白蛋白不连续密度梯度离心分离 B 细胞和 NK 细胞, 得到纯化的树突状细胞与 T 细胞, 备用, 台盼蓝拒染法检测细胞活力。

1.2.3 DC 的计数及其表面分子的表达 将上述分离出的单核细胞在 RPMI1640 中培养 16 h, 调整细胞浓度至  $5 \times 10^7/\text{L}$  单位, 分别与 CMRF-44 单抗及 FITC 标记的羊抗鼠 Ig (FITC-SAM) 孵育 20 min, 再用 10% 鼠血清封闭后加 PE-CD14 和 PE-CD19 单抗。通过 FCM 检测, DC 为单核细胞中 CMRF-44<sup>+</sup> C14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> 的亚群。记录 DC 在单核细胞中的相对数, 然后计算出 DC 的绝对数。将上述分离出的 DC 细胞 0.2 ml, 以 3% 多聚甲醛固定, 0.1% TritonX-100 0.2 ml 重悬, 各加 FITC 标记的 HLA-DR McAb 及 PE 标记的 CD86、CD80McAb, 过夜, 洗涤 2 次。重悬后, FCM 检测其表面 HLA-DR 及 CD86、CD80 表达水平。每个样本均分析 5 000 个细胞。

1.2.4 同种异体混合淋巴细胞反应 (MLR) 调整 T 细胞浓度到  $5 \times 10^5/\text{ml}$ , 分别与各组 DC、对照物共孵育 (比率为 20 : 1 ~ 60 : 1); 每组各加 6 孔, 前 3 孔为实验组, 后 3 孔为空白对照组。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 72 h, 于培养结束前 18 h 加入 [<sup>3</sup>H] 标记的胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR) 5μci/孔, 液闪计数仪 (LS6500, Beckman 公司) 检测<sup>3</sup>H-TdR 的掺入率, 结果用 3 孔的均值 (cpm ± SEM) 表示。以正常人的外周血 PBMC 为对照。

1.3 统计学处理

两组的检验结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 实验组与对照组的组间比较采用成组 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异有极显著性。

2 结果

2.1 DC 的计数的改变

DC 为单核细胞中 CMRF-44<sup>+</sup> C14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> 的亚群。正常人 DC 细胞的细胞数为  $(14.1 \pm 5.3) \times 10^6/\text{L}$  ( $3.3 \times 10^6 \sim 27.1 \times 10^6/\text{L}$ ), 在单核细胞中的比率为  $0.65\% \pm 0.30\%$  ( $0.15\% \sim 1.56\%$ ); 严重多发伤患者 DC 细胞的细胞数为  $(7.3 \pm 3.4) \times 10^6/\text{L}$  ( $2.3 \times 10^6 \sim 18.6 \times 10^6/\text{L}$ ), 在单核细胞中的比率为  $(0.35 \pm 0.21)\%$  ( $0.09\% \sim 0.70\%$ ); 正常人与多发伤患者的 DC 绝对细胞数相比差异有极显著性 ( $t = 3.178, P = 0.006 < 0.01$ ), 与占单核细胞的比率相比亦差异有极显著性 ( $t = 3.462, P = 0.004$ )。见图 1~3。

2.2 DC 表面标志的变化

严重多发伤患者 DC 表面 HLA-DR 及 CD80、CD86 的表达水平低于正常人, 两者相比差异有极显著 ( $P < 0.01$ ), 且以 CD86 的下降最为明显, 见表 1。

表 1 DC 表面分子 HLA-DR 和 CD80、CD86 的表达水平  
Table 1 The expression of HLA-DR, CD80 and CD86 on surface of dendritic cells

组别	例数	HLA-DR (%)	CD80 (%)	CD86 (%)
对照组	13	95.7 ± 7.6	89.1 ± 8.5	91.8 ± 9.6
严重多发伤组	24	52.4 ± 13.6	45.6 ± 9.1	39.2 ± 12.4
<i>t</i>		9.48	11.62	8.94
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

2.3 DC 刺激的淋巴细胞增殖反应

正常人 DC 作为刺激细胞的 cpm 值为  $(35\ 600 \pm 3\ 700)$ , 多发伤患者 DC 的 cpm 值为  $(15\ 700 \pm 2\ 300)$ ; 正常人 PBMC 对照组的 cpm 为  $(5\ 000 \pm 1\ 100)$ 。正常人 DC 免疫刺激能力明显强于患者 DC ( $t = 13.35, P < 0.01$ )。

3 讨论

严重多发性创伤后机体不仅遭受机械外力、微生物及其毒素的直接损害, 而且还由于众多的细胞因子和受体参与, 导致免疫功能紊乱, 主要表现为全身炎症反应综合征 (SIRS) 或代偿性抗炎反应综合征 (CARS)<sup>[2,3]</sup>。SIRS 和 CARS 之间的平衡决定了机体内环境的稳定性及创伤的后果。Th1 和 Th2 的选择性激活是决定这种平衡态发展方向的关键, 那么是什么因素决定了 Th 向 Th1 和 Th2 型细胞的分化呢? 最初的研究认为局部细胞因子微环境起了非常重要的作用。而近来的研究显示决定这种

反应的责任由 T 细胞转向 DC, 认为 Th 的分化是由 DC 所控制的<sup>[4]</sup>。

树突状细胞 (DC) 是天然免疫和获得性免疫的重要调节剂, 其表达高水平 MHC- I、MHC- II 类分子、共刺激分子和粘附分子, 并分泌多种细胞因子。DC 是体内功能最强的专职抗原提呈细胞 (APC), 在 T 细胞的活化中起着重要的作用<sup>[5]</sup>。体内的 DC 主要分为髓系 DC (DC1) 和淋巴系 DC (DC2) 两大类。DC1 与外周血单核细胞、粒细胞起源于共同的多能造血干细胞。DC2 与 T、NK 细胞起源于共同的多能造血干细胞。现认为, DC1 分泌 IL-12, 作用于 Th0 使之向 Th1 型细胞分化; DC2 分泌 IL-4, 作用于 Th0 使之向 Th2 分化<sup>[6]</sup>。在本试验中, 我们观察到分离自严重多发伤患者外周血单核细胞中的 DC (主要为 DC1) 的细胞数明显低于正常人 ( $P < 0.01$ )。这可能与导致创伤后 Th1 应答减弱, 而 Th2 应答增强有关。

在本试验中, 我们还观察到严重多发伤患者 DC 表面 MHC- I 分子 (HLA-DR) 及共刺激分子 (CD80、CD86) 的表达水平也明显低于正常人。DC 表面各种免疫分子正常表达是 DC 发挥其独特的抗原递呈和免疫调节功能的基础。DC 表面 MHC- I 类分子的低表达表明患者的 DC 无法提呈外来抗原或提呈外来抗原的能力低下, 也就无法诱导特异性 CTL 反应, 且 DC 对抗原的提呈还需要共刺激分子及粘附分子的参与, 它们的低表达也会影响 DC 的抗原提呈能力。导致这种现象可能也与多发伤后 Th1 细胞功能降低, 而 Th2 细胞功能提高有关。Th2 细胞可以产生多种抗炎症介质, 如 IL-4, IL-6, IL-10, TNF 等细胞因子, 以抑制 Th0 向 Th1 细胞分化, 抑制细胞免疫功能。

在我们的前期试验中, 观察到了创伤后抗炎症介质释放的增加, 创伤患者血清中 IL-6 与 IL-10 的浓度明显高于正常人<sup>[1]</sup>。IL-6 和 IL-10 在创伤后由 Th2 细胞分泌, 它们作用于 DC 成熟过程的早期阶段, 抑制协同刺激分子的表达, 降低 MHC- I 类分子的表达或使 DC 吞噬能力增强而抗原递呈能力下降<sup>[7,8]</sup>。IL-6、IL-10 还可以通过诱导凋亡的方式降低 DC2 的数量, 以抑制 Th2 应答<sup>[9]</sup>。综上可看出, DC 与 Th 细胞互为作用, 形成一种间接的负反馈调

节, 选择性地抑制 Th1 或 Th2 型反应的延续, 调节两种免疫反应之间的平衡。

未来关于创伤后免疫研究的焦点也许会从控制 Th1 和 Th2 选择性激活转到控制 DC 类型的产生上, 以帮助更好地理解创伤后免疫, 通过调控 DC 改变已存在或正在发生的 Th1 和 Th2 优势应答类型, 以调整 SIRS 和 CARS 之间的平衡而改善严重多发性创伤的预后。

(本文图 1~图 3 见插图 4-1)

## 参考文献

- 1 白祥军, 唐朝晖, 邹声泉, 等. 创伤早期患者外周血树突状细胞的变化. 中华实验外科杂志, 2003, 20: 978-981.  
Bai XJ, Tang ZH, Zhou SQ, et al. The change and clinical significance of peripheral blood dendritic cells in the early stage of traumatic patients. Chin J Expert Surg, 2003, 20: 978-981.
- 2 赵小纲. 多发伤治疗进展. 中华急诊医学杂志, 2003, 12: 642-643.  
Zhao XG. The progress of therapy on Multiple injuries, Chin J Emerg Med, 2003, 12: 642-643.
- 3 聂明明, 华积德. 严重多发伤的急救. 中华急诊医学杂志, 2003, 12: 647-648.  
Nie MM, Hua JD. The first aid of severity multiple injuries. Chin J Emerg Med, 2003, 12: 647-648.
- 4 McBride JM, Fathman CG. A complicated relationship: fulfilling the interactive needs of the T lymphocyte and the dendritic cell. Pharmacogenomics J, 2002, 2: 367-376.
- 5 Tang Zhaohui, Zou Shengqun, Qiu WH, et al. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. World J Gastroenterol, 2002, 84: 908-912.
- 6 Manickasingham SP, Edwards AD. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. Eur J Immunol, 2003, 33: 101-107.
- 7 Ratta M, Fagnoni F, Curti A, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. Blood, 2002, 100: 230-237.
- 8 Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced Interleukin 10 Suppresses the Ability of Splenic Dendritic Cells to Stimulate CD4 and CD8 T-Cell Responses. Cancer Res, 2003, 63: 2150-2157.
- 9 McBride JM, Jung T, de Vries JE, et al. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. Cell Immunol, 2002, 215: 162-172.

(收稿日期: 2004-01-09)

(本文编辑: 张万光)

## 严重多发伤患者外周血树突状细胞的变化

The variation of peripheral blood dendritic cell in patients with severe multiple trauma

(正文见第 225 页)

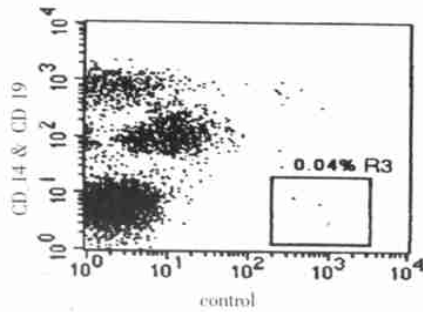


图 1 空白对照  
Fig 1 Blank control

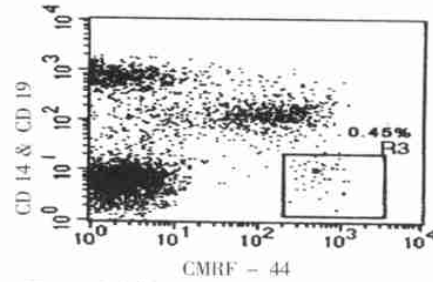
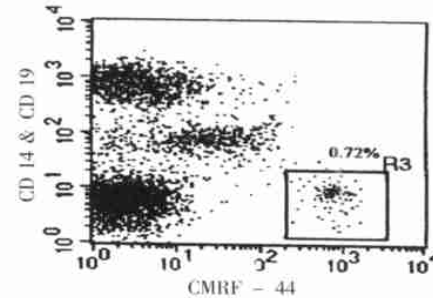


图 2 多发伤组  
Fig 2 Multiple injury group

图 3 正常人对照组  
Fig 3 Control group



## 新型结晶氨基酸处方 19AA 对严重创伤鼠的营养支持效果

Effects of new amino acid formula as nutritional support in rats after severe trauma

(正文见第 228 页)

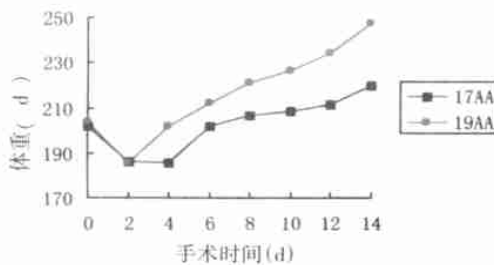


图 1 创伤大鼠体重的变化  
Fig 1 Changes of body weight in traumatic rats

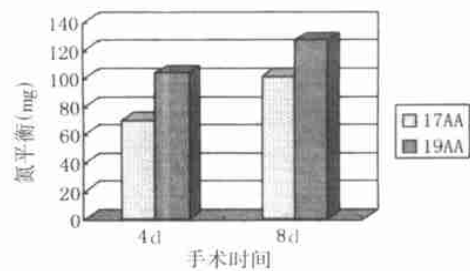


图 2 氮平衡的变化  
Fig 2 Changes of Nitrogen balance

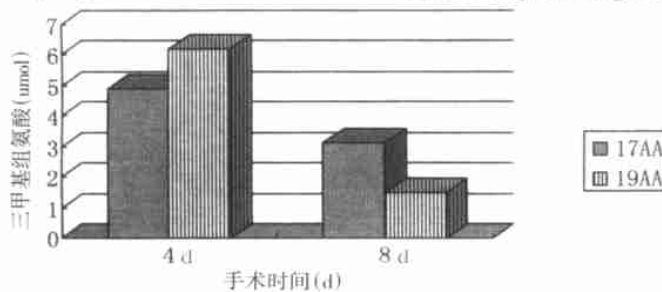


图 3 尿三甲基组氨酸排出量  
Fig 3 Urinary excretion 3-methylhistidine

插图 4 - 1