

创伤早期患者外周血树突状细胞的变化及临床意义

白祥军 唐朝晖 邹声泉 邱文洪

【摘要】 目的 探讨创伤后早期患者外周血树突状细胞(DC)变化及临床意义。方法 分离创伤患者(27例,创伤组)和健康人(12例,对照组)外周血树突状细胞;通过流式细胞仪检测各组的DC数量(CMRF44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。检测各组外周血血清中白细胞介素-6(IL-6)、IL-10的浓度。结果 创伤组DC细胞数(7.9 ± 3.2) $\times 10^6/L$ 明显低于对照组DC(14.9 ± 5.1) $\times 10^6/L$ ($P < 0.01$)。创伤组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细胞增殖能力对照组明显强于创伤组($P < 0.01$)。在创伤组中血清IL-6、IL-10的浓度(2.42 ± 0.33) $\mu g/L$ 和(1.49 ± 0.27) $\mu g/L$ 显著升高,与对照组比较差异有非常显著性($P < 0.01$)。结论 创伤早期患者外周血DC数量少,功能低下,与创伤后的免疫功能低下关系密切。

【关键词】 创伤; 树突状细胞; 免疫

The change and clinical signification of peripheral blood dendritic cells in the early stage of traumatic patients BAI Xiang-jun, TANG Zhao-hui, ZOU Sheng-quan, et al. Department of Traumatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To explore the change and clinical signification of peripheral blood dendritic cells of traumatic patients in the early stage. **Methods** DC were purified from peripheral blood of health volunteers (control group, 10 cases) and traumatic patients (trauma group, 27 cases). The number of DC and the expression levels of HLA-DR and CD80, CD86 on DC were detected by CMRF44 mAb labeling and flow cytometer. The supernatants of every group were collected and the concentration of IL-6 and IL-10 were measured by ELISA. The capacity of DCs-induced proliferation of T-cells wastested in a mixed leukocyte reaction (MLR). **Results** The DC counts in trauma groups [7.9 ± 3.2] $\times 10^6/L$ were obviously lower than in control groups [14.9 ± 5.1] $\times 10^6/L$, $P < 0.01$. The expression level of HLA-DR and CD80, CD86 of DC in trauma group were obviously down regulated as compared with those in control group ($P < 0.01$). There was significant difference in the concentrations of IL-6 and IL-10 between trauma group [2.42 ± 0.33] $\mu g/L$ and [1.49 ± 0.27] $\mu g/L$] respectively and control group ($P < 0.01$). The proliferation of T-cells induced by DC was obviously reduced in trauma group as compared with control group. **Conclusion** The number of DC was decreased and the function of DC was inadequacy in traumatic patients, which might be closely correlated with immunosuppression after trauma.

【Key words】 Trauma; Dendritic cell; Immune

严重创伤能诱发机体的免疫功能紊乱,与伤后感染率、死亡率的增高关系密切,对其机制的研究将有助于我们提高临床疗效。树突状细胞(DC)是体内功能最强的专职抗原提呈细胞(APC),其摄取和加工抗原,并分泌多种细胞因子,在激发T细胞的免疫应答中居中心地位^[1]。本研究旨在通过观察创伤早期患者外周血DC的变化,探讨其与创伤后免疫紊乱的关系。

材料与方 法

1. 实验分组:创伤组:以本院 2003 年 1~3 月间收

治的既往健康的创伤患者 27 例,其中男 19 例,女 8 例;年龄(38.5 ± 13.3)岁,此次损伤程度评分(ISS)平均为(20.7 ± 5.6)分,于创伤后 1 天采外周血 15 ml,肝素抗凝备用。对照组:健康志愿者 10 例,男 7 例,女 3 例;年龄 21~45 岁,平均年龄(36.0 ± 7.8)岁。

2. 主要试剂与仪器: Ficoll-Hypaque 分层液、鼠抗人的单克隆抗体 HLA-DR(异硫氰酸荧光素标记, FITC)、CD80(藻红蛋白标记, PE)、CD86(PE 标记)、CMRF44(美国 Pharmingen 公司)。流式细胞仪(FCM, BD 公司)。白细胞介素-10(IL-10)、IL-6 试剂盒(ELISA 法, 中科生物公司)。

3. 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 Ficoll-Hypaque

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科(白祥军、唐朝晖),普通外科(邹声泉);同济医学院免疫系(邱文洪)



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 RPMI 1640 中,调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml。将分离出的单个核细胞,E 花环试验分层法分离出除 T 细胞,Ig 包被粘附法、牛血清白蛋白不连续密度梯度离心法分离 B 细胞和 NK 细胞,得到纯化的树突状细胞,台盼蓝拒染法检测细胞活力^[2]。

4. DC 的计数及其表面分子的表达:将上述分离出得单核细胞在 RPMI1640 中培养 16 h,调整细胞浓度至 5×10^7 个/L,分别加 CMRF-44 McAb 及 FITC 标记的羊抗鼠 Ig(FITC-SAM),10% 鼠血清封闭,FCM 检测,记录 DC 在单核细胞中的相对数然后计算出 DC 的绝对数。将上述分离出得 DC 细胞 0.2 ml,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 5000 个细胞。

5. 同种异体混合淋巴细胞反应(MLR):调整 T 细胞浓度到 5×10^5 /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% CO₂ 孵箱培养 72 h,于培养结束前 18 h 加入 [³H] 标记的胸腺嘧啶核苷(³H-TdR) 5uci/孔,液闪计数器(LS6500,Beckman 公司)检测³H-TdR 的掺入率,结果用 3 孔的均值表示。以正常人的外周血 PBMC 为对照。

6. 细胞因子释放检测:ELISA 法检测各组血上清中 IL-10、IL-6 的平均浓度。

7. 统计学方法:数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1. DC 的计数的改变:正常人 DC 细胞的细胞数为 $(14.9 \pm 5.1) \times 10^6$ /L,患者 DC 细胞的细胞数为 $(7.9 \pm 3.2) \times 10^6$ /L,正常人与患者的 DC 细胞数相比差异有非常显著性 ($P < 0.01$)。

2. DC 表面标志的变化:创伤患者 DC 表面 HLA-DR 及 CD80、CD86 的表达水平低于正常人,两者相比差异有非常显著性 ($P < 0.01$),且以 CD86 的下降最为明显(表 1)。

表 1 DC 表面分子 HLA-DR 和 CD80、CD86 的表达水平(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HLA-DR	CD80	CD86
正常人	10	94.5 ± 10.3	88.1 ± 9.2	91.4 ± 7.9
创伤患者	27	60.3 ± 15.8*	46.4 ± 10.7*	37.2 ± 13.3*

注:与正常人比较,* $P < 0.01$

3. DC 刺激的淋巴细胞增殖反应:正常人的 DC 作为刺激细胞的 cpm 值为 $35\,000 \pm 5\,100$,创伤患者 DC 的 cpm 值为 $17\,000 \pm 2\,500$;正常人的 PBMC 对照组的 cpm 为 $4\,800 \pm 1\,100$ 。正常人 DC 免疫刺激能力明显强于患者 DC ($P < 0.01$)。

4. 细胞因子检测:血清中 IL-6 的浓度在创伤患者中为 $(2.42 \pm 0.33) \mu\text{g/L}$,在正常人中为 $(1.51 \pm 0.18) \mu\text{g/L}$,两者相比差异有非常显著性 ($P < 0.01$)。血清中 IL-10 的浓度在创伤患者中为 $(1.49 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$,在正常人中为 $(1.08 \pm 0.09) \mu\text{g/L}$,两者差异有非常显著性 ($P < 0.01$)。

讨 论

创伤时炎症细胞释放多种炎症介质,导致机体出现全身炎症反应综合征(SIRS)或代偿性抗炎症反应综合征(CARS)。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?近来的研究预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^[3]。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,一个成熟的 DC 可激活 100~3 000 个 T 细胞,并可活化初始型 T 细胞^[4]。

体内的 DC 主要分为髓系 DC(DC1)和淋巴系 DC(DC2)两大类,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。在本试验中,我们观察到分离自创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,我们还观察到创伤患者 DC 表面 MHC 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,而它们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,导致这种现象可能也与创伤后 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。

在本试验中,我们也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 ($P < 0.01$)。IL-6 和 IL-10 是创伤后由

Th2 细胞释放的抗炎症介质, IL-6 可作用于 DC 的前体细胞 CD14⁺ 使其吞噬能力增强而抗原呈递能力下降^[5]。IL-10 能作用于 DC 成熟过程的早期阶段, 影响 DC 的成熟分化, 从而使 CD4⁺ T 细胞对特定外源性抗原无反应力^[6]。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^[7]。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。

参 考 文 献

1 Tang ZH, Zou SQ, 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, 8:908-912.
 2 唐朝晖, 邹声泉, 邱文洪, 等. 胰腺癌患者外周血中 DC 细胞的表面特征与分离. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10:20-21.
 3 McBride JM, Fathman CG. A complicated relationship: fulfilling the interactive needs of the T lymphocyte and the dendritic cell. Pharmacogenomics J, 2002, 2:367-76.
 4 唐朝晖, 邹声泉, 邱文洪, 等. 癌细胞裂解物修饰的 DC 疫苗对胰癌荷瘤小鼠的免疫治疗作用. 中华普通外科杂志, 2003, 18:13-14.
 5 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.
 6 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.
 7 McBride JM, Jung T, 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:2003-07-11)

· 简报 ·

以棘突为参照物的椎弓根定位方法研究

王永安 朱海燕 秦晓川 朱均盛 杜长慧

经椎弓根固定技术的关键在于椎弓根螺钉的植入。有关椎弓根的定位方法已有较多报道^[1]。我们以棘突为参照物, 利用侧位 X 线片上椎弓根影像与棘突上缘之间的距离来确定进针平面, 利用正位片上椎弓根卵圆形投影与棘突侧缘的距离来选择进针位置, 并对 100 例成年男性的腰椎 X 线片进行了测量, 以探讨棘突与椎弓根之间的影像关系。

一、材料与与方法

1. 100 例 20~50 岁男性腰椎正侧位片, 腰椎无侧弯、无前后突及旋转畸形。

2. X 线片投照方法: 焦片距 85 cm, 物片距 5 cm, 电压 75 kV, 电流 200 mA, 加滤线盒。经三角函数计算, X 线片的放大比率为 1.21。

3. 测量方法: 先确定椎弓根卵圆形投影的中心点, 即纵横轴之交点。采用游标卡尺测量中心点至棘突上缘的垂直距离 A, 中心点至棘突侧缘的垂直距离, 右侧为 B, 左侧为 C。由同一位医师操作完成。

二、结果

1. 椎弓根卵圆形投影中心点至棘突上缘的垂直距离 A, L₁: (7.02 ± 3.12)

mm; L₂: (7.62 ± 2.72) mm; L₃: (3.99 ± 2.31) mm; L₄: (0.57 ± 3.47) mm; L₅: (-4.17 ± 5.02) mm。

2. 右侧椎弓根卵圆形投影中心点至棘突侧缘的垂直距离 B, L₁: (13.42 ± 2.00) mm; L₂: (13.77 ± 2.27) mm; L₃: (14.34 ± 3.08) mm; L₄: (15.65 ± 3.24) mm; L₅: (17.91 ± 3.46) mm。

3. 左侧椎弓根卵圆形投影中心点至棘突侧缘的垂直距离 C, L₁: (14.76 ± 2.27) mm; L₂: (15.00 ± 2.34) mm; L₃: (16.37 ± 2.87) mm; L₄: (17.67 ± 2.95) mm; L₅: (18.86 ± 3.15) mm。

4. 椎弓根卵圆形投影中心点至棘突侧缘的垂直距离左右两侧比较, 左侧大于右侧, L₁ 至 L₄ 节段, P < 0.01。L₅ 节段, 差异有显著性 (P < 0.05)。

三、讨论

椎弓根的定位方法很多, 进针时都有一定的失误率^[2-4]。手术中我们注意到, 棘突与椎弓根之间存在一定的对应关系。有时椎弓根的上缘紧靠上位棘突的下缘, 有时椎弓根的上缘紧靠同位棘突的上缘, 有时椎弓根与同位棘突上缘处于同一平面。前者因骨折情况不同而变化, 但椎弓根与同位棘突的位置关系较为固定。我们于术前术中仔细阅读 X 线片, 按棘突与椎弓根的高度差先确定

椎弓根所在平面, 而后根据椎弓根卵圆形投影与棘突侧缘的垂直距离确定进针的位置, 临床应用 88 例, 效果较满意。棘突最为直观, 比小关节及横突易显露, 易辨认。以棘突为参照物确定椎弓根位置, 简便易行, 定位准确, 不失为一种安全有效的方法。

本研究结果显示, L₁、L₂ 之椎弓根中心点与棘突上缘的垂直距离较大, L₃ 至 L₅ 逐渐减小, 至 L₄ 两者基本处于同一平面。L₅ 绝大多数呈现负值, 表明 L₅ 棘突上缘的位置高于椎弓根中心点, 样本中 -6~ 及 -4~ 组频数占近 50%。从 L₁ 至 L₅, 椎弓根中心点至棘突侧缘的垂直距离逐渐增大, 这与腰椎的解剖特点一致。

参 考 文 献

1 Weinstein JN, Ryderik BL, Rausching W. Anatomic and technical considerations of pedicle screw fixation. Clin Orthop, 1992, 284:34-46.
 2 邱贵兴, 吴之康, 李世英, 等. Steffee 手术在脊柱外科的应用. 中华骨科杂志, 1992, 12:167-170.
 3 徐荣范, 王以进, 谭远超, 等. 椎弓根导向仪的研制及临床应用. 中国脊柱脊髓杂志, 1998, 8:71-74.
 4 符波, 王书成, 陈鹰镇, 等. 经椎弓根内固定的失误及并发症防治. 中国脊柱脊髓杂志, 1996, 6:174-175.

(收稿日期:2003-04-19)

作者单位: 441004 湖北襄樊, 东风汽车公司襄樊医院骨科(王永安、朱海燕、秦晓川), 放射科(朱均盛), 基防科(杜长慧)

