

- Physician, 2016, 19(2): E291-E300.
- [7] 李成勇, 祁全, 刘杨, 等. 经皮椎间孔镜手术髓核摘除量对疗效的影响[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2018, 33(11): 77-78.
- [8] 蒋毅. 微创内窥镜下经不同入路治疗重度脱出移位腰椎间盘突出症[J]. 中国骨伤, 2017, 30(2): 100-104.
- [9] 刘磊, 李业成, 刘守正, 等. 经皮椎间孔镜与椎板开窗髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症的 Meta 分析[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2019, 16(1): 21-27.
- [10] 杨春鹏, 黎永生, 秦忠军, 等. 椎间孔镜下髓核摘除术治疗巨大型腰椎间盘突出症的临床效果[J]. 广西医学, 2019, 41(1): 29-32.
- [11] SHARMA A, SARGAR K, SALTER A. Temporal evolution of disc in young patients with low back pain and stress reaction in lumbar vertebrae[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2017, 38(8): 1647-1652.
- [12] 范胜利, 吴健. 经皮椎间孔镜下髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症[J]. 临床骨科杂志, 2017, 20(4): 401.
- [13] 伊立, 董志坚, 王锁良, 等. 经皮椎间孔镜两种手术入路治疗钙化型腰椎间盘突出症的疗效比较[J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(4): 277-282.
- [14] 胥成平, 王健, 谭芳. 影响腰椎间盘突出症患者腰神经根减压术后神经功能恢复效果的危险因素分析[J]. 颈腰痛杂志, 2018, 39(1): 38-40.
- [15] 张建洛, 杨宏涛, 冯宏伟, 等. 身痛逐瘀汤联合西医治疗腰椎间盘突出症半椎板切除减压术后下肢疼痛及麻木残余症状疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(4): 415-418.
- [16] 张国刚, 程海, 余峰, 等. 单纯椎板开窗髓核摘除术与椎板开窗髓核摘除纤维环缝合术治疗未成年人腰椎间盘突出症疗效比较[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(5): 423-425.
- [17] 唐尚文, 王弘, 王凌挺, 等. 小切口椎板开窗髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症的近期疗效[J]. 皖南医学院学报, 2018, 37(3): 27-29.
- [18] 林俊, 糜检, 郭义, 等. 髓核摘除术对腰椎间盘突出症患者椎间孔镜手术效果的影响[J]. 医疗装备, 2017, 30(18): 112-113.
- (收稿日期: 2019-08-01 修回日期: 2019-11-25)
- 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 04. 031

脓毒症患者 cf-DNA/NETs、炎症细胞亚群以及血清 IL-6、IL-10 水平变化的意义

闫雪梅

新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 新疆乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探讨脓毒症患者中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)、炎症细胞亚群变化, 以及血清白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)水平变化的临床意义。方法 选取该院 2016 年 11 月至 2018 年 11 月收治的脓毒症患者 48 例作为脓毒症组, 给予相应的治疗。纳入同期 30 例健康志愿者作为健康组, 测定脓毒症组患者治疗前后以及健康组 cf-DNA/NETs、炎症细胞亚群以及血清 IL-6、IL-10 水平。结果 脓毒症组患者治疗前杀伤性 T 细胞比例明显低于健康组, NK 细胞比例、cf-DNA/NETs 水平及血清 IL-6、IL-10 水平明显高于健康组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组的辅助性 T 细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$)。与治疗前相比, 脓毒症组患者治疗后的辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞比例明显增高, 血清 IL-6、IL-10 水平以及 NK 细胞比例、cf-DNA/NETs 均明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 cf-DNA/NETs、炎症细胞亚群与 IL-6、IL-10 在脓毒症发展过程中发挥了重要作用。

关键词:脓毒症; 炎症细胞亚群; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)04-0537-03

脓毒症是因为感染产生的全身炎症反应综合征, 进一步发展会引起患者脓毒性休克, 影响患者生命健康^[1-2]。脓症患者体内有强烈的炎症应答, 可能有促炎和抗炎反应失衡紊乱的现象。在脓毒症的炎症应答调控中, 多种免疫细胞和免疫分子扮演着重要的角色^[3-4]。本研究旨在观察治疗前后脓症患者中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)、炎症细胞亚群变化以及血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)水平变化, 并探讨其临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2016 年 11 月至 2018 年 11 月收治的脓症患者 48 例作为脓毒症组。纳入标

准: (1)符合脓毒症 3.0^[5]中的脓毒症诊断标准; (2)年龄 > 18 岁; (3)患者知情同意。排除标准: (1)伴有严重基础疾病, 如心肺复苏后、特重型颅脑损伤, 预后极差, 可能成为主要死因的病症; (2)合并原发性心、脑、肾、肺等器官功能障碍; (3)恶性肿瘤; (4)合并自身免疫性疾病。脓毒症组中男 29 例, 女 19 例; 年龄 19~77 岁, 平均(45.3±9.5)岁; 急性生理学及慢性健康状况评分系统(APACHE)Ⅱ评分为(22.35±5.12)分; 序贯器官衰竭(SOFA)评分为(12.35±3.12)分; 脓毒症的诱因: 肺部感染 24 例, 腹腔感染 18 例, 植入物感染 3 例, 化脓性胆管炎 2 例, 盆腔脓肿 1 例。纳入同期 30 例健康志愿者作为健康组, 其中男 22 例, 女 8

例;年龄 19~76 岁,平均(44.8±8.6)岁。两组研究对象在年龄、性别之间差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 脓毒症组按照《中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)》^[6]的推荐意见进行集束化治疗,给予针对原发病的对症治疗、抗感染、营养支持、免疫调节、对症支持等治疗,并加用乌司他丁 30 万 IU/次静脉注射,3 次/日,连续 7 d。

1.2.2 外周血单个核细胞(PBMCs)和血清的分离 脓毒症组患者在治疗前及治疗 7 d 后清晨、健康组在清晨采集外周静脉血 13 mL,其中抗凝静脉血 10 mL 采用密度梯度离心法分离 PBMCs,调整细胞水平为 10^6 个/mL,在 37℃、5%CO₂ 湿化空气环境选择含 10%胎牛血清的 RPMI1640 中培养。非抗凝静脉血 3 mL,3 000×g 离心 10 min 分离血清。

1.2.3 流式细胞术测定外周血炎症细胞 取 1×10^6 个细胞置于流式细胞检测专用试管中,分别加入抗 CD3-FITC、抗 CD4-perCPCy5.5、抗 CD8-APC(购自美国 eBioscience 公司)各 10 μL。4℃ 避光孵育 20 min,用 PBS 缓冲液冲洗 1 次,1 200 r/min 离心 5 min,用 PBS 缓冲液冲洗 1 次,采用 FACSCalibur 型流式细胞仪(购自美国 R&D 公司),采用 CellQuest 软件获取并分析,采用 FlowJo 软件分析测定结果。

1.2.4 细胞因子测定 采用人 Luminex 细胞因子检测试剂盒,Luminex LX-200 分析仪(包括 xPONENT 3.1 软件购自美国 BD 公司)检测血清 IL-6、IL-10 水平。

1.2.5 cf-DNA/NETs 检测 血浆复温后取 100 μL,采用基于 PicoGreen 荧光染料法,用荧光酶标仪测定荧光值,按照标准曲线计算游离 DNA(cf-DNA/NETs)水平。

1.3 统计学处理 研究所得数据均采取 SPSS 22.0 统计软件分析。其中,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脓毒症组治疗前后及健康组炎症细胞比例比较 脓毒症组患者治疗前杀伤性 T 细胞比例明显低于健康组,NK 细胞比例明显高于健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组的辅助性 T 细胞上比例差异无统计学意义($P>0.05$)。与治疗前相比,脓毒症组治疗后的辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞比例明显增高,NK 细胞比例明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 脓毒症组治疗前后及健康组 cf-DNA/NETs、IL-6、IL-10 水平比较 如表 2 所示,脓毒症组患者治疗前血清 IL-6、IL-10 水平以及血浆 cf-DNA/NETs 明显高于健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

与治疗前相比,脓毒症组患者治疗后血清 IL-6、IL-10 水平及血浆 cf-DNA/NETs 明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 脓毒症组治疗前后及健康组炎症细胞比例比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	时间	辅助性 T 细胞	杀伤性 T 细胞	NK 细胞
健康组	30		34.72±6.74	32.73±7.82	11.21±3.32
脓毒症组	48	治疗前	33.05±6.49	28.17±6.63*	13.14±3.41*
		治疗后	33.98±7.44 [#]	30.25±6.52 [#]	9.18±2.24 [#]

注:与健康组比较,* $P<0.05$;与组内治疗前比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 脓毒症组治疗前后及健康组血清 IL-6、IL-10 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	cf-DNA/NETs (μg/L)
健康组	30		18.72±3.24	6.33±1.45	202.54±40.56
脓毒症组	48	治疗前	36.38±8.55*	8.19±1.54*	452.78±182.45*
		治疗后	27.19±8.78 [#]	7.31±1.42 [#]	324.41±56.45 [#]

注:与健康组比较,* $P<0.05$;与组内治疗前比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨 论

如今脓毒症被认为是宿主对感染应答失调引起脏器功能失衡的症候群,关于其病理机制尚未完全清楚,主要与促炎反应和抗炎反应的失衡,微循环障碍,免疫功能紊乱等有关。严重感染引起的全身性炎症反应及器官功能损害是因为激活单核/巨噬细胞、内皮细胞等炎症细胞所引起的^[7-8]。免疫应答过度激活,活化的单核/巨噬细胞能够识别其特异性受体,释放前炎症介质(如 TNF-α、IFN-γ、IL-1、IL-6、IL-8 等),进而引起细胞因子的瀑布样分级反应。但是相关学者发现,免疫抑制并非相对促炎反应而发生的代偿性反应,是在感染或损伤一开始就有的,说明严重感染最早是免疫低反应^[9]。为此,严重感染一方面可能有免疫亢进,另一方面也有免疫抑制,免疫治疗的重点在于重建免疫平衡稳态。

本研究结果显示,脓毒症组治疗前杀伤性 T 细胞比例明显低于健康组,NK 细胞比例明显高于健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$),但辅助性 T 细胞在脓毒症患者中的水平与健康组无明显差异。相关学者在动物实验中发现 NK 细胞的表达和本研究类似^[10]。在细菌感染中,NK 细胞具有促进免疫应答的作用。本研究结果显示脓毒症组患者治疗前血清 IL-6、IL-10 水平明显高于健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-6 主要由 T 细胞和巨噬细胞合成,具有强烈的致炎活性,升高的 IL-6 对前炎症反应有分化作用,也可引起免疫功能失调^[11]。既往研究认为,IL-6 在严重脓毒症和脓毒性休克中的上调与预后存在紧密联系,提示该细胞因子在脓毒症发生、发展中发挥重要作用^[12-13]。IL-10 是抗炎细胞因子,主要由 Th2 细胞、单核/巨噬细胞合成,能释放 TNF-α、IL-6、IL-8

等致炎介质,还可以抑制炎症细胞的增殖作用,是体内的抗炎细胞因子^[14-15]。本研究结果显示,脓毒症组患者治疗前血清 IL-10 水平明显高于健康组,提示患者可能处于轻微的免疫抑制状态。本研究对脓毒症组进行集束化治疗并加用乌司他丁,乌司他丁可以独立抑制多种酶的活性,是理想的抗炎药物。治疗后脓毒症组患者的辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞比例明显高于治疗前,NK 细胞比例明显低于治疗前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。进一步说明 NK 细胞在脓毒症的发生、发展中有促进免疫应答的作用,乌司他丁起到了清除氧自由基以及抑制炎症递质释放的作用,能增加辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞的数量,减少 NK 细胞的数量^[16-17]。本研究中,与治疗前相比,脓毒症组治疗后的血清 IL-6、IL-10 水平明显更低,说明该治疗方案可降低血清 IL-6、IL-10 水平。相关学者在脓毒症合并多脏器功能衰竭综合征病例中也得到了类似的结论^[18],患者血清中炎症因子 IL-4、IL-6、IL-10 均有不同程度的下降,但只有在 IL-6 上有明显差异,提示乌司他丁可诱导降低炎症递质的表达,调控脓毒症治疗过程中的免疫应答。

在脓毒症发展过程中,中性粒细胞的凋亡发挥了重要作用,其受到脂多糖刺激后,部分表面抗体释放增加,能够反映细菌感染,并且使 NETs 释放增加,诱导 IL-1 β 、IL-8 等炎症介质的释放。而且当病原体侵入机体后,NETs 核心成分组蛋白水平可进行多种修饰,进而对免疫功能产生影响,造成损伤。本研究结果显示,脓毒症组患者治疗前血浆 cf-DNA/NETs 明显高于健康组,治疗后血浆 cf-DNA/NETs 明显下降。提示 NETs 可作为脓毒症某时期反映炎症损伤程度的标志物,值得进一步深入探讨。

综上所述,cf-DNA/NETs、炎症细胞亚群与 IL-6、IL-10 在脓毒症发展过程中发挥了重要作用,患者存在严重的免疫平衡紊乱。集束化治疗并加用乌司他丁能改善炎症细胞亚群的比例,发挥免疫调控作用,调节 IL-6、IL-10、cf-DNA/NETs 水平,有增强机体免疫防御的作用,但炎症因子间的作用形成错综复杂的调控网络,免疫状态形成确切机制十分复杂,有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李雅玲,何勤,黎惟广,等.血清 PCT、Lac 及内毒素水平在重症肺炎合并脓毒症患儿的临床检测意义[J].临床肺科杂志,2018,23(6):181-182.
- [2] 王烁,吴彩军,杨军,等.脓毒症休克患者心功能的动态变化及对预后的影响[J].中华急诊医学杂志,2018,27(4):389-393.
- [3] 卢露,潘国权,汤鲁明,等. PICCO 指导下液体复苏对脓毒症休克患者免疫功能及炎症介质的影响[J].中华全科医学,2017,15(4):562-564.
- [4] 甘朝晖.连续性血液净化对多发伤并发脓症患者炎症

- 状态、免疫应答、红细胞糖代谢的影响[J].海南医学院学报,2017,23(1):116-119.
- [5] SHANKAR-HARI M,PHILLIPS G S,LEVY M L,et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock:for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA,2016,315(8):775-787.
- [6] 中华医学会重症医学分会.中国严重脓毒症脓毒性休克治疗指南(2014)[J].中国实用乡村医生杂志,2015,54(18):5-10.
- [7] 乔增海,尚志博.乌司他丁对重症脓症患者血浆 PCT、CRP 水平的影响及对心肝肾的保护作用[J].河北医药,2018,40(8):53-55.
- [8] 孙磊,郑俊波,于凯江.脓症患者持续免疫抑制状态时的免疫监测和治疗进展[J].中国医刊,2018,53(6):13-17.
- [9] GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J,TSAGANOS T,SPYRIDAKI E,et al. Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis[J]. Crit Care,2006,10(6):R166.
- [10] SZABO P A,RUDAK P T,CHOI J,et al. Invariant NKT cells are pathogenic in the HLA-DR4-transgenic humanized mouse model of toxic shock syndrome and can be targeted to reduce morbidity[J]. J Infect Dis,2017,215(5):824-829.
- [11] 孙梦杰,屠亚茹,欧阳慧子,等.血必净注射液及其药代标示物对脓毒症大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 表达的影响[J].天津中医药大学学报,2018,37(1):13-15.
- [12] 赵露茜,朱国栋,张靖轩,等.脓毒症大鼠 IL-6、TNF- α 、TH 水平和 D2 活性变化及血必净注射液的干预研究[J].实用医学杂志,2018,34(1):2670-2674.
- [13] 黄林枫,熊岚,吴奎,等.脓毒症患儿血浆 miR-146a、miR-223 表达与 IL-6、IL-10、TNF- α 水平变化的临床意义分析[J].现代生物医学进展,2017,17(32):6324-6327.
- [14] 李春,叶梅.0~3 岁反复上呼吸道感染患儿血清细胞因子 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的水平及意义[J].河北医药,2017,39(1):14-16.
- [15] 田冰,刘璟.紫菜多糖对肠道病毒 71 型乳鼠模型 T 细胞亚群及细胞因子的免疫干预作用[J].中国生物制品学杂志,2018,31(2):145-149.
- [16] 齐安龙,柴艳芬,姚咏明.乌司他丁在脓毒症中的细胞保护作用及其机制[J].中华医学杂志,2015,95(39):3235-3237.
- [17] 樊楚明,杨欣悦,任靖宇,等.乌司他丁对脓毒症大鼠血管内皮细胞损伤保护作用及机制研究[J].中国临床药理学杂志,2016,32(8):723-726.
- [18] 王丹,夏炎火,周小洁,等.大承气汤联合乌司他丁对脓毒症合并多脏器功能衰竭综合征患者降钙素原、C 反应蛋白及免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2015,33(6):1414-1417.