

• 论 著 •

# 创伤后多器官功能障碍综合征患者外周骨髓源抑制细胞细胞的表达

刘 佳, 魏 明<sup>△</sup>, 涂 玲, 梁颖红, 龚艳杰, 张宜花

(郑州大学第五附属医院输血科, 河南郑州 450052)

**摘要:**目的 探讨创伤后多器官功能障碍综合征(MODS)患者外周骨髓源抑制细胞(MDSCs)的表达在诊断 MODS 疾病严重程度和预后判断中的临床意义。方法 分别采集 66 例 MODS 患者、78 例非 MODS 患者和 37 例健康志愿者外周血,以 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 作为 MDSCs 的标志,采用流式细胞术检测 MDSCs 细胞的表达;以 MODS 评分评估疾病严重程度;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,并分析患者 MDSCs 的表达与疾病严重程度评分和 IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平的相关性。结果 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达为(11.84±2.18)%明显高于非 MODS 组的(6.52±0.37)%和健康对照组的(1.18±0.22)%( $P<0.05$ );MODS 患者死亡组(15.66±1.68)%较存活组(9.48±1.56)%明显升高( $P<0.05$ )。MODS 患者血清 IL-10、TNF- $\alpha$  水平较非 MODS 组和健康对照组明显增高( $P<0.05$ )。MODS 患者中死亡组血清 IL-10、TNF- $\alpha$  水平较存活组明显升高( $P<0.05$ );相关分析显示,MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达率与 TNF- $\alpha$  水平和 MODS 评分成正相关( $r$  分别为 0.342 6、0.387 9, $P<0.05$ )。结论 外周血 MDSCs 水平变化可能与疾病的严重程度和预后相关。

**关键词:**创伤后; 多器官功能障碍综合征; 全身炎症反应综合征; 髓源抑制细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)17-2473-03

## Expression of myeloid-derived suppressor cells in patients with post-traumatic multiple organ dysfunction syndrome

Liu Jia, Wei Ming<sup>△</sup>, Tu Ling, Liang Yinghong, Gong Yanjie, Zhang Yihua

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**Abstract: Objective** To study the quantity change and significance of myeloid-derived suppressor cells(MDSCs) in patients with post-traumatic multiple organ dysfunction syndrome(MODS). **Methods** 66 patients with MODS, 34 patients with non-systemic inflammatory response syndrome(SIRS) and 37 healthy volunteers were enrolled in this study. Peripheral blood was collected and CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> were used as markers of MDSCs. The percentage of MDSCs was determined by flow cytometry and serum interleukin-10(IL-10) and tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) levels were determined by ELISA. The MODS scoring system was used to assess patients' disease severity. The relationship was analyzed between MDSCs and TNF- $\alpha$  and MODS score. **Results** The percentage of MDSCs in peripheral blood of healthy volunteers was(1.18±0.22)%, after MODS, the percentage of MDSCs in peripheral blood was(11.84±2.18)% and(6.52±0.37)% in patients with non-MODS, the percentages of MDSCs in three groups showed significant differences( $P<0.05$ ). Serum IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with MODS group and non-MODS group were significant differences( $P<0.05$ ). The correlation was found between MDSCs percentage in peripheral blood and MODS score and TNF- $\alpha$ ( $r=0.342\ 6, 0.387\ 9$  respectively,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The increase proportion of MDSCs in peripheral blood correlates with the onset of infection in patients with MODS, indicating that the expansion of MDSCs in peripheral blood may play important roles in immune dysfunction after MODS.

**Key words:** post-traumatic; multiple organ dysfunction syndrome; systemic inflammatory response syndrome; myeloid-derived suppressor cell

创伤是临床常见的危重症之一,特别是免疫/炎性反应的失控,促炎细胞因子的大量释放和抗炎反应过度强烈均可导致多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[1-3]</sup>。创伤后机体在出现全身炎症反应综合征(SIRS)的同时,常伴随免疫功能障碍,主要表现为 T 淋巴细胞功能抑制,这是创伤患者发生继发感染和脓毒症的重要原因<sup>[4]</sup>。髓源抑制细胞(MDSCs)是一群具有共同特性的高度异质性细胞的总称,包括未成熟粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞和髓系祖细胞等。其共同特性为缺乏成熟髓系细胞标志,具有抑制 T 淋巴细胞的功能<sup>[5]</sup>。MDSCs 是免疫系统重要的调节性细胞,在维持机体免疫系统平衡中起重要作用,它的变化和功能障碍与肿瘤免疫逃逸和自身免疫性疾病的发生密切相关<sup>[6-7]</sup>。脓毒症动物模型外周血、骨髓和脾脏中 MD-

SCs 数量明显增加,是脓毒症发生时 T 细胞功能障碍和免疫抑制的关键性机制<sup>[8-9]</sup>,创伤后 MODS 患者外周血中其水平的变化及临床意义鲜见报道。为此本研究对创伤后 MODS 患者外周血 MDSCs(CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞)的表达进行了检测,并对 MDSCs 的表达与细胞因子水平、创伤严重程度评分及患者预后的关系进行了分析,旨在进一步揭示 MDSCs 在创伤后 MODS 免疫抑制功能中的作用。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 2 月至 2014 年 10 月郑州大学第五附属医院重症医学科收治并诊断为 MODS 的 66 例患者作为 MODS 组,诊断符合 1995 年全国危重病急救医学学术会议制订的 MODS 病情分期的诊断标准和严重程度评分标

准<sup>[10]</sup>及 SIRS 和脓毒症诊断符合美国胸科医师协会/危重病医学会 (ACCP/SCCM) 制定的标准<sup>[11]</sup>, 剔除合并肿瘤、自身免疫性疾病等疾病的患者。其中男 35 例、女 31 例, 年龄 19~67 岁, 平均(41±12)岁。原发疾病包括胸部创伤 20 例, 腹部实质脏器损伤 18 例, 腹部空腔脏器损伤 20 例, 骨关节损伤 8 例。选取同期于本院住院的非 MODS 患者 78 例(非 MODS 组), 其中男 44 例、女 34 例, 年龄 18~68 岁, 平均(42±13)岁。另外选取 37 例同期于本院进行健康体检者作为健康对照组, 其中男 21 例、女 16 例, 年龄 20~69 岁, 平均(42±13)岁, 均无近期感染、自身免疫性疾病等。各组间在年龄、性别构成方面进行比较, 差异均无统计学意义( $P>0.05$ ), 具有可比性。按照医院伦理委员会要求, 所有参与研究者签署知情同意书。MODS 病例随访至出院或死亡, 以死亡或存活判定预后, 最终死亡 18 例, 生存 22 例。

**1.2 仪器与试剂** 主要检测仪器为美国 BD 公司的 FACS Canto 流式细胞仪。试剂: 人 CD11b-FITC 抗体、CD14-PE 抗体、CD33-cy5 抗体以及上述抗体相应的同型对照抗体均购自美国 BD 公司; 白细胞介素-10 (IL-10) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 检测试剂盒分别为法国 Diaclone 公司, 郑州豫兴生物技术有限公司产品。

**1.3 方法** MODS 患者在入院后 24 h 内进行 MODS 评分。MODS 组于确诊当日, 非 MODS 组于留院观察第 1 日抽取外周静脉血 6 mL, 平均分为 2 份。3 mL EDTA 抗凝血参照文献<sup>[4]</sup>用于 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 检测; 另 3 mL 非抗凝血以 3 000 r/min, 离心 10 min 后分离提取血清标本, 置于 -70 °C 超低温冰箱保存待测, 血清用于 IL-10 和 TNF- $\alpha$  浓度的测定。采用流式细胞术检测外周血 MDSCs 表达, 流式细胞术参照文献<sup>[12]</sup>的方法进行。采集患者外周血 (EDTA 抗凝) 后混匀, 取 100  $\mu$ L 全血, 加入 CD11b-FITC 抗体、CD14-PE 抗体、CD33-Cy5 抗体各 2  $\mu$ L, 冰上避光孵育 30 min, PBS 洗涤, 红细胞裂解液裂解、洗涤、固定、重悬后, 用流式细胞仪进行检测, BD-FACSDiva 软件分析数据。ELISA 检测外周血细胞因子水平, 按照试剂盒说明书进行, 检测血清 IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 两独立样本的比较, 服从正态分布者用  $t$  或校正  $t(t')$  检验, 不服从正态分布者用 Wilcoxon 秩和检验。外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达率与疾病严重程度评分、血清 IL-10、TNF- $\alpha$  水平的相关性分析采用 Pearson 相关分析。预后及影响因素分析采用 Logistic 回归分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 MODS 患者血清 IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平变化** MODS 组患者血清 IL-10 [(55.65±8.67) pg/mL]、TNF- $\alpha$  [(60.23±34.14) ng/L] 水平与非 MODS 组 IL-10 [(41.12±6.89) pg/mL]、TNF- $\alpha$  [(28.76±21.53) ng/mL] 水平比较及与健康对照组 IL-10 [(30.04±5.72) pg/mL]、TNF- $\alpha$  [(20.87±10.64) ng/mL] 水平比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); MODS 组死亡患者血清 IL-10 [(78.6023±15.74) pg/mL] 和 TNF- $\alpha$  [(89.72±38.91) ng/L] 水平高于存活组患者 IL-10 [(40.45±8.41) pg/mL] 和 TNF- $\alpha$  [(63.64±24.23) ng/L] 水平, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**2.2 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞的表达** MODS 组患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达百分率为 (11.86±2.18)%, 与非 MODS 组的 (6.52±0.37)% 和健康

对照组的 (1.18±0.22)% 比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); MODS 组死亡患者 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达百分率为 (15.66±1.68)%, 高于存活组患者的 (9.48±1.56)%, 两者比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**2.3 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达与疾病严重程度评分、血清 IL-10、TNF- $\alpha$  水平的相关性** MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达百分率与 TNF- $\alpha$  水平和 MODS 评分成正相关性 ( $r$  分别为 0.342 6、0.387 9,  $P<0.05$ ), 与 IL-10 水平无相关性 ( $P>0.05$ )。

**2.4 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达与衰竭器官个数关系** 以 MODS 患者的衰竭器官个数进行分组 (分为 I、II、III 组), 各组外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达百分率均随衰竭器官个数增加而升高, 各组间比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 1。

**表 1 不同衰竭器官数患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达率**

组别	衰竭器官数(n)	例数(n)	细胞表达率(%, $\bar{x}\pm s$ )
I 组	2	16	9.06±3.12
II 组	3	14	12.63±2.21
III 组	4	6	15.25±2.10

**2.5 外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达与 MODS 预后的关系** 采用 Logistic 回归分析判断外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达与 MODS 患者预后的关系, 结果显示 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达的相对比值比 (OR) 为 0.78, 95% 可信区间 (CI) 为 0.72~0.91,  $P=0.04$ 。

**2.6 影响 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达的因素** 对影响 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达因素的 Logistic 回归分析显示, 严重创伤、严重感染和器官衰竭个数均是影响患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达的因素, 见表 2。

**表 2 影响 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 细胞表达的因素分析**

影响因素	Wald	OR	95%CI	P
严重创伤	5.724	0.862	0.719~0.914	0.026
严重感染	8.145	0.906	0.723~0.965	0.002
器官衰竭个数	9.679	0.948	0.736~0.989	0.001

**3 讨 论**

创伤、SIRS、MODS、多器官功能衰竭 (MOF)、死亡作为创伤并发症的演变过程已达成共识<sup>[13]</sup>。创伤后并发症如感染、ARDS 和 MODS 等的发生率及病死率居高不下, 主要原因是上述并发症发展速度极快。特别是病情发展到 MOF 阶段, 即使采取最及时的治疗措施都难以遏止其发展进程<sup>[14]</sup>。因此如能早期实施干预措施, 对逆转并发症的演变和降低病死率都有重要意义。

创伤后机体常继发 SIRS 和脓毒症, 出现免疫功能紊乱, 表现为包括抗原呈递细胞 (APC) 和 T 细胞等多种免疫细胞功能障碍, 辅助性 T 细胞 (Th) 向 Th2 方向分化等<sup>[15]</sup>。MDSCs 是机体免疫系统重要的调节性细胞, 在维持机体免疫系统平衡中起重要作用<sup>[5]</sup>。有文献报道, 人类 MDSCs 表型各不相同, 但迄今为止报道最多的 MDSCs 表型为 CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>

HLA-DR<sup>-</sup>[2]。为此,笔者采用 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 作为 MDSCs 的标志,检测 MODS 患者外周血 MDSCs 的变化。本研究显示,MODS 组 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 细胞表达高于非 MODS 组和健康对照组( $P < 0.05$ ),MODS 死亡组患者外周血 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 表达高于 MODS 生存组患者( $P < 0.05$ )。经相关分析,MODS 评分与 MODS 患者外周血 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 细胞表达成正相关性( $P < 0.05$ ),表明创伤后并发 MODS 的患者外周血 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 细胞表达明显增高,提示它们在创伤后免疫功能障碍中起重要作用。

TNF- $\alpha$  是各种细胞因子和炎性介质失控性释放前产生的关键性细胞因子,被认为是细胞因子爆发中心,能促进多种因子的释放[16]。IL-10 是由多种细胞(主要以 T 淋巴细胞)产生的炎症抑制因子,其作用是抑制炎症反应。IL-10 可以通过抑制单核巨噬细胞的抗原递呈、细胞活化及继发的细胞免疫应答,抑制单核细胞本身的黏附作用及其介导的黏附反应,抑制活化的单核细胞分泌 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症促进因子,发挥其抑制炎症反应的作用[17]。本研究显示,MODS 组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度明显高于非 MODS 组和健康对照组,MODS 死亡组患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度高于 MODS 生存组患者( $P < 0.05$ )。经相关分析,TNF- $\alpha$  与 MODS 等疾病严重度评分值成正相关,提示血清 TNF- $\alpha$ 、IL-10 水平可反映 MODS 患者的病情严重程度和预后。Logistic 回归分析显示,严重创伤、严重感染和器官衰竭个数均是影响患者外周血 CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 细胞表达的危險因素。

综上所述,创伤后并发 MODS 可导致外周血 MDSCs、IL-10、TNF- $\alpha$  水平发生变化,其变化与 MODS 病情发展和患者预后密切相关,因此动态监测它们的变化对 MODS 的发生、发展及病情转归具有一定预警作用。临床在早期据此适度地应用相关抑制剂,阻止炎症介质的大量表达和释放,对于防止 MODS 的发生是一种新的治疗途径。

参考文献

[1] 沈其猷,李培,刘彪,等. 创伤后 MODS 危险因素分析[J]. 中华创伤杂志,2007,23(7):531-534.  
 [2] 魏明,付聿铭,张俊峰,等. 创伤合并多器官功能障碍综合征患者血清 LTB4 和 LPS 的变化[J]. 中华创伤杂志,2010,26(4):331-333.  
 [3] 魏明,涂玲,梁颖红,等. p38MAPK 和 COX-2mRNA 在创伤后多器官功能障碍综合征患者外周血中的表达[J]. 中华急诊医学杂志,2011,20(6):593-596.  
 [4] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock[J]. Lancet,

2005,365(9453):63-78  
 [5] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2009,9(3):162-174.  
 [6] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and Cancer[J]. J Immunol,2009,182(8):4499-4506.  
 [7] Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells[J]. Cancer Res,2008,68(8):2561-2563.  
 [8] Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, et al. CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress[J]. J Immunol,2006,176(4):2085-2094.  
 [9] Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis[J]. J Exp Med,2007,204(6):1463-1474.  
 [10] 王今达,王宝恩. 多器官功能障碍综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J]. 中国危重病急救医学,1995,7(6):346-347.  
 [11] Anonymous. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. Crit Care Med,1992,20(6):864-874.  
 [12] Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock [J]. Crit Care Med,2004,30(4):536-555.  
 [13] Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer[J]. J Immunol,2001,166(1):678-689.  
 [14] Simkova V, Baumgart K, Radermacher P, et al. Year in review 2006: Critical Care-ultiple organ failure, sepsis, and shock[J]. Crit Care,2007,11(4):221.  
 [15] Nonaka K, Saio M, Suwa T, et al. Skewing the Th cell phenotype toward Th1 alters the maturation of tumor-infiltrating mononuclear phagocytes[J]. J Leukoc Biol,2008,84(3):679-688.  
 [16] Mizuno Y, Ohama E, Hirato J, et al. Nestin immunoreactivity of Purkinje cells in Creutzfeldt-Jakob disease[J]. J Neurol Sci,2006,246(1/2):131-137.  
 [17] 李冠兰,刘先哲. 基质金属蛋白酶与 MODS 的研究进展. 现代生物医学进展,2006,6:115-119.

(收稿日期:2015-03-22)

(上接第 2472 页)

metabolism-risk assessment and results from a prospective study [J]. Pharmacopsychiatry,2009,42(1):29-34.  
 [3] 崔开艳,刘兰芬,杨丽敏. 齐拉西酮与利培酮对精神分裂症患者泌乳素及体质量、血糖、血脂的影响[J]. 精神医学杂志,2010,23(1):7-9.  
 [4] Findling RL, Cavuş I, Pappadopulos E, et al. Ziprasidone in adolescents with schizophrenia: results from a placebo-controlled efficacy and long-term open-extension study[J]. J Child Adolesc Psychopharmacol,2013,23(8):531-544.  
 [5] Taylor DM, Measkill R. Atypical antipsychotics and weight gain-a systematic review[J]. Acta Psychiatr Scand,2000,101(6):416-

432.  
 [6] Ryan MC, Thakore JH. Physical Consequences of schizophrenia and its treatment: the metabolic syndrome[J]. Life Sci,2002,71(3):239-257.  
 [7] Weiden PJ, Mckell JA, McDonnell DD. Obesity as a risk factor for antipsychotic noncompliance[J]. Schizophr Res,2004,66(1):51-57.  
 [8] Wirshing DA, Spellberg BJ, Erhart SM, et al. Novel antipsychotics and new onset diabetes[J]. Biol Psychiatry,1998,44(8):778-783.  
 [9] 汪春运. 齐派西酮的精神科应用[J]. 国外医学. 精神病学分册,2005,32(1):40-43.

(收稿日期:2015-04-12)