

• 论 著 •

脓毒症患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86 和 T 淋巴细胞亚群表达水平的变化及其协同表达研究*

张 盛¹, 唐吉斌^{1△}, 鲁厚清², 汪 俊²

铜陵市人民医院: 1. 检验科; 2. 重症医学科, 安徽铜陵 244000

摘要:目的 探讨脓毒症患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86 和 T 淋巴细胞亚群表达水平的变化及其协同表达的意义。方法 选取 2020 年 1—7 月铜陵市人民医院重症医学科收治且确诊的脓毒症患者(脓毒症组)作为研究对象,并以同期入院体检健康者作为对照组。脓毒症组患者入院第 1 天、第 3 天及第 5 天抽取外周静脉血,用流式细胞术分析 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺和 T 淋巴细胞亚群表达水平,同时检测对照组入院体检当日上述各指标水平并对两组各指标进行分析比较。结果 脓毒症组入院第 1 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺、总 T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞表达水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);脓毒症组入院第 3 天、第 5 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺、CD4⁺T 淋巴细胞表达水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脓毒症患者体内存在免疫麻痹,CD14⁺单核细胞 HLA-DR 及 CD86 均可以评估脓毒症患者免疫状况。

关键词:脓毒症; 单核细胞; T 淋巴细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.010

中图法分类号:R459.7

文章编号:1673-4130(2021)18-2219-04

文献标志码:A

Study on the synergistic expression of CD14⁺ monocytes HLA-DR, CD86 and T lymphocyte subsets in patients with sepsis*

ZHANG Sheng¹, TANG Jibin^{1△}, LU Houqing², WANG Jun²

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Critical Care Medicine, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244000, China

Abstract: Objective To investigate the changes in the expression levels of HLA-DR, CD86 and T lymphocyte subsets of peripheral blood monocytes in patients with sepsis and the significance of their cooperative expression. **Methods** Confirmed sepsis patients (sepsis group) admitted to the critical care medicine department of Tongling People's Hospital from January to July 2020 were selected as the research objects, and healthy patients admitted to the hospital during the same period were selected as the control group. Peripheral venous blood was collected from the sepsis group on the first, third and fifth day of admission, and the expression levels of CD14⁺ monocytes HLA-DR, CD86⁺CD14⁺ and T lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry. At the same time, the above indexes of the control group were detected on the day of admission physical examination, and the indexes of the two groups were analyzed and compared. **Results** On the first day after admission, the expression levels of CD14⁺ monocytes HLA-DR, CD86⁺CD14⁺, total T lymphocytes and CD4⁺T lymphocytes in peripheral blood of sepsis group were significantly lower than those of control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of CD14⁺ monocytes HLA-DR, CD86⁺CD14⁺ and CD4⁺T lymphocytes in peripheral blood of in sepsis group were significantly lower than those in control group on the third and fifth day after admission, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** There is immune paralysis in patients with sepsis. CD14⁺ monocytes HLA-DR and CD86 can evaluate the immune status of patients with sepsis.

* 基金项目:安徽省铜陵市卫生健康委员会医学科研项目(卫科研[2019]5号)。

作者简介:张盛,男,主管技师,主要从事流式细胞学研究。△ 通信作者, E-mail: Jibin158@163.com。

本文引用格式:张盛,唐吉斌,鲁厚清,等.脓毒症患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86 和 T 淋巴细胞亚群表达水平的变化及其协同表达研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(18):2219-2221.

Key words: sepsis; monocyte; T lymphocyte subsets

脓毒症是机体对感染反应失调而导致危及生命的器官功能障碍,是创伤、烧伤、休克等临床急危重症者的严重并发症之一,也是重症监护室患者主要死亡原因之一^[1]。近年来研究表明,在脓毒症的发病过程中,机体经历了免疫麻痹阶段,即 T 淋巴细胞无反应,CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86 表达水平下降,导致机体无法控制原发感染,并增加继发感染的易感性^[2]。本研究探讨脓毒症患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86 和 T 淋巴细胞亚群表达水平的变化,为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)的诊断标准^[2]筛选脓毒症患者,选取 2020 年 1—7 月铜陵市人民医院重症医学科收治且确诊的脓毒症患者 44 例(脓毒症组)作为研究对象,其中男性 25 例、女性 19 例,平均(69.05±16.02)岁。在标本采集之前,经过医院伦理委员会验证。详细了解入选人群的相关疾病资料,排除患有免疫功能性疾病(艾滋病、血液系统疾病、肿瘤)和原发慢性病(高血压、糖尿病),以及长期服用激素、免疫抑制剂等人群。另选取同期本院体检中心 20 例体检健康者作为对照组,其中男性 10 例,平均(65.00±4.90)岁;女性 10 例,平均(66.20±5.29)岁。两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法 采用流式细胞方法,仪器为贝克曼 Dx-Flex 流式细胞仪,试剂为 BD 的 CD14PE、CD86PE/

Cy7、CD45FITC、HLA-DRAPC 及北京同生的 CD3FITC-CD8PE-CD45PerCP-CD4APC。收集对照组体检当日和脓毒症组入院第 1 天、第 3 天及第 5 天的血液标本,标本为清晨空腹外周血 2 mL,注入乙二胺四乙酸二钾抗凝管。一管用 CD14PE-CD86PE/Cy7-CD45FITC-HLA-DRAPC 四色方案标记,另一管采用 CD3FITC-CD8PE-CD45PerCP-CD4APC 四色方案,严格按照试剂盒说明书进行操作和结果判读。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件包进行统计分析。脓毒症组入院第 1 天、第 3 天、第 5 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺和 T 淋巴细胞亚群表达水平分别与对照组比较,采用独立样本 *t* 检验。脓毒症组入院第 1 天、第 3 天、第 5 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺、总 T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞进行两两比较,采用配对 *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

脓毒症组入院第 1 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺、总 T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞表达水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);脓毒症组入院第 3 天、第 5 天患者外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺、CD4⁺T 淋巴细胞表达水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组外周血 CD14⁺单核细胞 HLA-DR、CD86⁺CD14⁺和 T 淋巴细胞亚群表达水平比较

组别	CD14 ⁺ 单核细胞 HLA-DR	CD86 ⁺ CD14 ⁺	总 T 淋巴细胞	CD4 ⁺ T 淋巴细胞	CD8 ⁺ T 淋巴细胞	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
脓毒症组						
入院第 1 天	69.03±18.72	92.03±10.82	59.64±19.10	32.23±14.33	24.63±10.18	1.95±0.54
入院第 3 天	69.10±21.10	93.26±11.72	65.93±16.19 ^a	37.96±13.32 ^a	25.40±11.98	2.02±0.27
入院第 5 天	72.85±23.54	93.28±11.75	72.61±11.57 ^{ab}	43.83±10.81 ^{ab}	26.08±11.50	2.20±1.03
对照组	98.94±0.93	99.61±0.62	73.20±1.69	51.29±2.93	23.17±2.02	2.24±0.29
<i>t</i> ₁	7.111	3.116	3.156	5.868	-0.484	0.598
<i>P</i> ₁	<0.001	0.003	0.002	<0.001	0.630	0.552
<i>t</i> ₂	6.295	2.409	1.996	4.405	-0.821	0.623
<i>P</i> ₂	<0.001	0.019	0.050	<0.001	0.415	0.535
<i>t</i> ₃	4.942	2.402	0.228	2.996	-1.115	0.094
<i>P</i> ₃	<0.001	0.021	0.821	0.004	0.271	0.926

注:*t*₁、*P*₁ 为脓毒症组入院第 1 天各指标与对照组比较;*t*₂、*P*₂ 为脓毒症组入院第 3 天各指标与对照组比较;*t*₃、*P*₃ 为脓毒症组入院第 5 天各指标与对照组比较;与同组入院第 1 天比较,^a $P<0.05$;与同组入院第 3 天比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

近年来,随着研究不断深入,人们认识到在脓毒症发病过程中,机体并非总是处于一成不变的免疫激活,在脓毒症的初始阶段,以大量分泌炎性介质为主要特征,而随着脓毒症的进展,机体经历了一个免疫抑制阶段,即免疫麻痹。在临床上,脓毒症一旦合并免疫抑制,治疗也变得相当棘手^[3-4]。目前已有很多针对免疫麻痹治疗的临床前研究,例如重组人白细胞介素-17、白细胞介素-15、 γ 干扰素、粒细胞共刺激因子及粒-巨细胞共刺激因子、PD-1 抗体及间充质干细胞治疗等^[5]。对脓毒症患者进行单纯抗炎抑或是改善免疫麻痹治疗都是不恰当的,而是应该根据脓毒症免疫状态的演变,采取不同的对策。故而正确识别脓毒症患者的免疫状态,实施精准化免疫治疗显得尤为重要^[6]。脓毒症免疫麻痹至今仍未有统一的诊断标准。研究表明免疫麻痹的核心在于 T 淋巴细胞无反应性,因此,在 T 细胞被激活至发挥效应的所有过程,任何环节出现问题都会表现出免疫麻痹,目前主要体现在 3 个方面:(1)单核细胞 HLA-DR 表达水平明显减少;(2)抗原提呈能力下降;(3)产生促炎细胞因子的能力明显下降^[7-8]。本研究脓毒症组入院第 1 天、第 3 天及第 5 天患者外周血 CD14⁺ 单核细胞 HLA-DR、CD86⁺ CD14⁺ 均低于对照组,证实了脓毒症患者体内存在免疫抑制。

机体的免疫状态是极其复杂的过程,任何环节的障碍都会导致免疫麻痹。针对免疫麻痹的监测,其中单核细胞 HLA-DR 表达水平明显减少(<30%)被认为是多种临床疾病并发症的预测指标^[9]。HLA-DR 是单核细胞表面表达的具有特征性的受体,它是主要组织相容性抗原复合体 II (MHC II) 的一部分,在外来抗原加工、处理、递呈及调节免疫细胞中起重要作用,其功能是把经单核吞噬细胞吞噬并处理后的抗原提呈给辅助细胞继而激活包括 T 细胞、B 细胞和吞噬细胞在内的所有免疫细胞,所以 HLA-DR 足够的表达对于特异性免疫和非特异性免疫系统功能都具有重要的临床意义^[10-11]。有研究证实,在外科手术、烧伤、大面积创伤、脑卒中、胰腺炎等情况下,脓毒症患者外周血 CD14⁺ 单核细胞数量不降低,说明其仍与健康者一样高表达 CD14⁺,使机体处于防御状态,具备对外源性细菌脂多糖等致病因素的潜在识别能力。但患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 HLA-DR 抗原表达受到抑制,可能会使机体的抗感染能力受到一定的影响,其表达水平的减少可预测脓毒症并发症的发生^[11]。有学者研究报道 HLA-DR 表达水平与脓毒症患者继发感染率和病死率相关,而且发现 HLA-DR

表达水平减少发生在入院后 1.0~4.0 d,继发感染多出现在入院后 9.4 d,提示 HLA-DR 表达水平降低能够在一定程度上提前预知继发感染^[12]。但是,对于抗原提呈过程,仅具有充足的 HLA-DR 表达是不够的,尚需要共刺激分子参与,其中最重要的一对分子是 T 细胞表面的 CD28 分子和抗原提呈细胞(APCs)表面的 CD80/86 相互作用后传递给 T 细胞的共刺激信号^[13-14]。当 CD80/86 表达水平下降,使得单核细胞和 T 淋巴细胞相互作用的亲和力明显减弱,因此 T 淋巴细胞不能被激活,导致 T 淋巴细胞无反应性^[15-16]。脓毒症患者一旦出现免疫麻痹,将会丧失对原发感染的控制能力,同时增加对患者二次感染的易感性^[17-18]。本研究结果表明,CD14⁺ 单核细胞 HLA-DR、CD86 对于临床判断脓毒症患者的免疫活化功能具有临床应用价值。与此同时,为了更好地说明细胞的活化功能在脓毒症患者中的应用价值,本研究还对脓毒症组入院第 1 天、第 3 天及第 5 天患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达水平与对照组进行比较,通过分析得出脓毒症组入院第 1 天、第 3 天及第 5 天患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞低于对照组,说明脓毒症患者细胞抗感染功能下降,容易反复感染病原菌。

综上所述,本研究证实 CD14⁺ 单核细胞 HLA-DR、CD86 的协同表达水平对于评价脓毒症患者免疫状况及其预后具有重要的临床意义。对脓毒症患者免疫状况的研究,为合理使用免疫调理治疗提供了理论依据。

参考文献

- [1] 李晗,田李均,韩旭东. 脓毒症体内外模型研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2020,20(1):102-106.
- [2] 高经华,刘喆滢,刘志峰. 共抑制分子在脓毒症免疫功能障碍中作用的研究进展[J]. 中华危重病急救医学,2020,32(1):121-125.
- [3] 费志永,于维,常媛媛,等. 脓毒症及脓毒性休克的诊断与治疗进展[J]. 医疗装备,2020,33(22):200-201.
- [4] STEINHAGEN F, SCHMIDT S V, SCHEWE J C, et al. Immunotherapy in sepsis-brake or accelerate[J]. Pharmacol Ther,2020,208(1):107476.
- [5] MIAN Z, MONOWAR A, MAHENDAR O, et al. Correction of immunosuppression in aged septic rats by human ghrelin and growth hormone through the vagus nerve-dependent inhibition of TGF- β production[J]. Mol Med, 2020,26(1):71-77.
- [6] 虞竹溪,郝迎迎,刘宁,等. 单核细胞 HLA-DR 和 T 淋巴细胞亚群预测严重创伤继发感染的临床研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(4):401-403.
- [7] WANG J, WANG X T, LIU D W, et al. (下转第 2227 页)

- J Hyg Environ Health, 2015, 218(3):313-318.
- [3] 潘小平, 洪晓绿, 孟萍, 等. DNA 甲基转移酶 1 在乳腺癌患者中的表达及意义[J]. 微循环学杂志, 2020, 30(1):34-38.
- [4] 梁松鹤, 杨昕光, 高春艳, 等. DNMT1 表达与乳腺癌临床预后相关性研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31(4):71-76.
- [5] KURUPPU S, RAJAPAKSE N W, SMITH A I, et al. Endothelin-converting enzyme-1 inhibition and renoprotection in end-stage renal disease [J]. Pflugers Arch, 2013, 465(7):929-934.
- [6] LEO E, MANCINI M, CASTAGNETTI F, et al. DNA methyltransferase drives transcriptional down-modulation of β -catenin antagonist chibby1 associated with the bcr-abl1 gene of chronic myeloid leukemia [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(4):589-597.
- [7] MARCHAL C, MIPTTO B. Emerging concept in DNA methylation: role of transcription factors in shaping DNA methylation patterns [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(4):743-751.
- [8] GAO X, FU Z K, CHEN S, et al. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province [J]. Clin Breast Cancer, 2010, 10(1):373-377.
- [9] KANAI Y, USHIJIMA S, NAKANISHI Y, et al. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers [J]. Cancer Lett, 2003, 192(1):75-82.
- [10] KELEMEN L E, SELLERS T A, SCHILDKRAUT J M, et al. Genetic variation in the one-carbon transfer pathway and ovarian cancer risk [J]. Cancer Res, 2008, 68(1):2498-2506.
- [11] ZHANG L, YANG W, ZHU X, et al. P53 inhibits the expression of P125 and the methylation of POLD1 gene promoter by downregulating the Sp1-induced DNMT1 activities in breast cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1):1351-1360.
- [12] PIETRUSZEWSKA K L, SZYMCZYK A K, STEFANSKA B, et al. Folic acid enforces DNA methylation-mediated transcriptional silencing of PTEN, APC and RARbeta2 tumour suppressor genes in breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(2):623-628.
- [13] 高翔. DNMT-1 基因多态性与黑龙江省汉族女性乳腺癌发病的相关性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2010.
- [14] SUN M Y, YANG X X, XU W W, et al. Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese woman from South China [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(4):4330-4341.
- (收稿日期:2020-12-01 修回日期:2021-08-21)
-
- (上接第 2221 页)
- Induction and deduction in sepsis-induced cardiomyopathy: five typical categories [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(18):2205-2211.
- [8] JOSE J R F, MARCOS J R B, LAURA M P, et al. Outlining key inflammation-associated parameters during early phase of an experimental gram-negative sepsis model in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(4):326-333.
- [9] 胡荣华, 郑颜磊, 程飞, 等. 脓毒症精准免疫治疗的新进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2019, 26(4):504-506.
- [10] ZHUANG Y, PENG H, CHEN Y, et al. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2017, 22(1):1344-1354.
- [11] WINKLER M S, RISSIEK A, PRIEFLE M, et al. Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF alpha response: a diagnostic tool for immunosuppression [J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0182427.
- [12] PICKKERS P, KOX M. Towards precision medicine for sepsis patients [J]. Crit Care, 2017, 21(1):11-15.
- [13] 曲冰杰, 郭剑颖, 王宏伟. 脓毒症患者免疫紊乱中树突细胞与 T 细胞分化及表型研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12):1487-1490.
- [14] TRZUPEK D, DUNSTAN M, CUTLER A J, et al. Discovery of CD80 and CD86 as recent activation markers on regulatory T cells by protein-RNA single-cell analysis [J]. Genome Med, 2020, 12(1):55-59.
- [15] 庄安琪, 蒋毅, 杨曼, 等. mTOR-自噬通路对脓毒症小鼠海马小胶质细胞表型的影响 [J]. 天津医药, 2019, 47(7):705-708.
- [16] KAEMPFER R. Bacterial superantigen toxins, CD28, and drug development [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(11):459-464.
- [17] 郭磊, 沈华, 张铮, 等. 脓毒症的新型生物标志物研究进展 [J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(2):155-158.
- [18] 石玉英, 段训新, 黄龙. 老年社区获得性肺炎并脓毒症患者 sCD14 和 CD14⁺ HLA-DR 表达及意义 [J]. 医学信息, 2020, 33(2):86-88.
- (收稿日期:2020-11-28 修回日期:2021-08-02)