文章编号:1000-5404(2005)14-1509-03

论著

老年人严重创伤后免疫抑制的研究

孟海东[1],赵晓东[1],陈晓光[2],郭旭生[3],孙 丹[4],果应菲[1],党 伟[1] (解放军总医院304临床部:[1]急救科,[2]麻醉科,[3]临床部SICU,[4]临床部创伤研究室,北京 100037)

提 要:目的 对比老年人与青中年人严重创伤后免疫指标与炎性介质的变化,探讨老年人群创伤后免疫抑制的程度与变化特征。**方法** 31例年龄>65岁,平均(72.4±7.6)岁,ISS评分>20分,平均(27±5)分的老年创伤病人与中青年创伤病人[平均年龄(30.6±16.2)岁,平均ISS评分(29±6)分]配对分组,在来诊后和伤后2、4、6、8 d采用流式细胞术连续检测T细胞亚群比例和$CD14^+$单核细胞人类白细胞抗原-DR(HLA-DR)表达,同时观察免疫球蛋白IgA、IgG、IgM,补体C3、C4,C反应蛋白(CRP)和促炎介质肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素6(IL-6),白介素10(IL-10)血浆水平。**结果** 老年组伤后TNF-α、IL-6、IL-10低于青中年组,但持续上升时间延长,在6~8 d后IL-10血浆浓度已高于青中年组。老年组伤后4~8 d Th1/Th2比值下降明显,$CD14^+$ HLA-DR表达下调。**结论** 老年人创伤后发生的免疫抑制比青中年人群更显著,表现为单核-T淋巴细胞免疫功能受抑,而抗炎细胞因子清除不利可能是导致这一免疫功能紊乱的重要原因。

关键词: 创伤;老年人;免疫功能;T淋巴细胞亚群;Th1/Th2漂移;$CD14^+$单核细胞人类白细胞抗原-DR;抗炎细胞因子
中图法分类号: R392.11; R446.62; R641.02 **文献标识码:** A

The elderly versus the middle-aged in immune suppression after severe trauma

MENG Hai-dong[1], ZHAO Xiao-dong[1], CHEN Xiao-guang[2], GUO Xu-sheng[3], SUN Dan[4], GUO Ying-fei[1], DANG Wei[1] ([1]Emergency Department, [2]Department of Anasthesia, [3]SICU, [4]Department of Trauma Research, No. 304 Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To compare the immune functions between two different-age groups suffering severe injuries and investigate whether the poor adaptive immune responses of trauma in the elderly are a result of disintegration of the intact monocyte-T cell interaction. **Methods** Sixty-two severely injured patients with an ISS over 20 points were divided into two groups: the elderly group over 65 years and the middle-aged group aging 18-65 years. Subsets of $CD4^+$ helper T lymphocytes (Th1/Th2) and human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on $CD14^+$ monocytes were measured by flow cytometry (FCM) at admission and day 2, 4, 6, 8 after injury. Levels of cytokine expressions and other immunological markers such as IgA, IgG, IgM, C3, C4 in each group were examined to determine the different inflammatory and immune response following trauma. **Results** Within two days after injury, there were significantly high productions of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin (IL)-10 levels in the middle-aged group, whereas the patients of the elderly group showed a slower elimination of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after injury. Monocyte HLA-DR expressions, as well as the Th1/Th2 ratios, were significantly lower in the elderly group than the middle-aged group. **Conclusion** The shift from Th1 to Th2 and the lower $CD14^+$ HLA-DR expression suggest more critical immune suppression states for aged patients following trauma. The impaired ability to eliminate serum anti-inflammatory cytokines may contribute to the dramatically paralyzed cell-mediated immunity (CMI) in the elderly, which could represent a more precise target for treating post-injury immune suppression in aged patients.

Key words: trauma; the elderly; immune function; lymphocytes subsets; Th1/Th2 shift; $CD14^+$ monocyte human leukocyte antigen DR; anti-inflammatory cytokine

随着社会急救体系的完善和急救技术的进步,创伤病人早期病死率已经明显下降,而治疗后期由于感染等并发症出现而导致的脓毒症与多脏器功能不全已

作者简介:孟海东(1973-),男,天津市人,硕士,主治医师,主要从事急救方面的研究,发表论文10余篇。电话:13693369652
收稿日期:2005-06-23;修回日期:2005-07-06

逐渐成为引起死亡的重要原因。目前已认识到严重创伤可诱发机体免疫麻痹状态，从而失去对外源性微生物的天然抵抗作用。老年人在创伤后感染的发生率和病死率明显高于青中年人群，提示遭遇创伤后发生的免疫抑制程度更严重。本研究通过对比青中年与老年严重创伤病人炎症反应水平与主要免疫指标的变化，探讨老年人创伤后免疫抑制的变化特征，为有针对性的实施创伤免疫调理治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验分组

2003年3月至2005年3月我院急诊接诊的严重创伤(ISS评分>20分)患者，采用配对分组方式分为：①老年创伤组：31例，男性24例，女性7例，平均年龄(72.4±7.6)岁，ISS平均分值(27±5)分，颅脑损伤19例，脊柱骨折4例，腹腔脏器伤1例，骨盆骨折3例，大血管伤1例，四肢骨折13例，合并失血性休克6例。②青中年创伤组：31例，男性24例，女性7例，平均年龄(30.6±16.2)岁，ISS平均(29±6)分，颅脑损伤21例，脊柱骨折3例，血气胸2例，腹腔脏器伤3例，骨盆骨折2例，大血管伤2例，四肢骨折14例，合并失血性休克5例。配对条件：性别相同，ISS分值接近，最重损伤(AIS分值最高区域)之解剖部位相同，并排除入院1周内死亡病例。患者分别于来诊即刻(伤后1~6 h)、入院后2、4、6、8 d采外周静脉血10 ml，肝素抗凝备检。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI1640细胞培养液(Hyclone公司)，T淋巴细胞内因子激动剂：佛波醇乙酯(PMA)(Sigma公司)、离子霉素(ionomycin)(Sigma公司)、GolgiStop(BD公司)，溶红素(lysing solution)(BD公司)，破膜剂(FACS Permeabilizing)(BD公司)，单核细胞、T淋巴细胞表面抗原及T淋巴细胞胞内细胞因子染色荧光标记单克隆抗体和同型对照：CD3-PerCP、CD8-APC、IFN-r-FITC/IL-4-PE、r2a-FITC/r1-PE、CD14-PE、HLA-DR-FITC、IgG2a-FITC、IgG2b-PE(BD公司)，人TNF-α、IL-6、IL-10酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(晶美公司)，FACS/Calibur四色流式细胞仪(BD公司)，7170自动生化仪(日立公司)。

1.3 T细胞亚群检测

1 ml全血以1 ml RPMI1640稀释，加入终浓度50 ng/ml PMA、1 μg/ml离子霉素、1 μl/ml GolgiStop激活细胞内因子表达，37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育6 h，洗涤离心去上清，2 ml溶红素溶红10 min，洗涤，加入20 μl CD3-PerCP、5 μl CD8-APC荧光标记抗体避光染色15 min，0.5 ml破膜剂破膜10 min，再次洗涤后加入20 μl IFN-r-FITC/IL-4-PE(同型对照加入20 μl r2a-FITC/r1-PE)避光染色30 min，洗涤并加入1%多聚甲醛1 ml固定。流式细胞术(FCM)检测：以FS-SS淋巴细胞群圈门，分析$CD3^+$ $CD8^+$与$CD3^+$ $CD8^-$T淋巴细胞比率，再以$CD3^+$ $CD8^-$(即$CD4^+$T淋巴细胞)圈门，分析Th1、Th2亚群比率。

1.4 $CD14^+$单核细胞人类白细胞抗原-DR(HLA-DR)检测

200 μl全血2试管，分别加入10 μl CD14-PE、10 μl HLA-DR-FITC和10 μl IgG2a-FITC、10 μl IgG2b-PE(阴性对照)，避光染色15 min，加入400 μl溶红素溶红10 min，再加入3 ml蒸馏水，室温孵育20 min，离心去上清，1%多聚甲醛1 ml固定。FCM检测：$CD14^+$-SS圈门，分析$CD14^+$单核细胞比率和$CD14^+$ HLA-DR表达率。

1.5 IgA、IgG、IgM、C3、C4、C反应蛋白(CRP)的检测

2 ml静脉血分离血清，用BN100特种蛋白仪以散射比浊度法进行测定。

1.6 TNF-α、IL-6、IL-10的检测

2 ml静脉血分离血清-20 ℃保存，采用ELISA双夹心抗体法集中检测。

1.7 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，使用Stata 8.0统计软件，组间比较采用t检验，多时间点数据比较采用方差分析。

2 结果

2.1 创伤后CRP与细胞因子水平的变化

老年创伤组病人来诊时CPR与TNF-α、IL-6、IL-10血清浓度较青中年组低，两组病人伤后上述指标均随时间变化均呈显著上升趋势，2~4 d青中年组TNF-α、IL-10、CRP仍显著高于老年组，但达到8 d后青中年组炎症因子水平已明显回落，老年组却未呈现这一变化趋势，两组对比IL-6、CRP已无统计学差异，而IL-10、TNF-α水平老年组则显著高于青中年组，见表1。

表1 两组病人伤后促炎与抗炎细胞因子与CRP变化($n=31$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and CRP in 2 groups after wound ($n=31$，$\bar{x}\pm s$)

Group	On admission (d)	TNF-α (μg/L)	IL-6 (μg/L)	IL-10 (μg/L)	CRP (mg/L)
Elderly	0	11.31±3.80**	1.36±0.47**	1.05±0.11**	92±17*
	2	14.23±2.99**	2.11±0.31**	1.36±0.13**	103±24**
	4	16.45±4.12**	2.54±0.28	1.44±0.18*	122±19*
	6	18.32±4.63	2.66±0.40	1.47±0.26*	78±16
	8	17.32±3.01**	2.56±0.36	1.59±0.15*	54±11
Middle-aged	0	14.56±2.78	1.62±0.24	1.34±0.08	104±22
	2	19.55±4.98	2.42±0.19	1.97±0.22	128±21
	4	22.46±5.10	2.67±0.33	1.57±0.21	131±16
	6	19.11±3.08	2.71±0.29	1.60±0.19	80±13
	8	14.33±4.20	2.60±0.32	1.49±0.17	49±14

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* middle-aged

2.2 创伤后主要免疫指标变化

严重创伤病人IgA、IgG、IgM、C3、C4最低值在入院时测得，老年组IgA、C3水平显著低于青中年组，其余指标两组无差异。伤后2~6 d两组血清免疫球蛋白、补体逐渐回升至正常水平，8 d时两组各指标对比无显著差异，见表2。

同组内不同时间点T淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值改变无规律，老年组与青中年组比较4~8 d时$CD4^+/CD8^+$比值显著降低。$CD4^+$T淋巴细胞Th1/Th2比值在创伤后随时间的迁延而逐渐下降，老年组该比值在6~8 d时明显低于青中年组。创伤后不同时间的增加未影响两组病人$CD14^+$单核细胞比率，而$CD14^+$单核细胞HLA-DR表达在2 d后均降低，老年人组下调更明显，伤后4、8 d HLA-DR表达两组差别显著，见表3。

表 2　两组病人伤后免疫球蛋白检测结果（$n=31, \bar{x} \pm s$）

Tab 2　Detection results of IG in 2 groups after wound（$n=31, \bar{x} \pm s$）

Group	On admission (d)	IgA	IgG	IgM	C3	C4
Elderly	0	0.98 ±0.19 **	6.47 ±1.44	0.55 ±0.23	1.07 ±0.16 *	0.22 ±0.05
	2	1.94 ±0.25 *	8.98 ±2.05 **	0.83 ±0.39	1.33 ±0.24	0.24 ±0.07
	4	2.17 ±0.28	11.40 ±2.79	1.47 ±0.24	1.17 ±0.19 **	0.24 ±0.11
	6	2.65 ±0.34 *	10.48 ±3.04	1.19 ±0.30 *	1.41 ±0.30	0.25 ±0.07
	8	2.35 ±0.50	11.22 ±2.33	1.21 ±0.36	1.39 ±0.27	0.27 ±0.17
Middle-aged	0	1.41 ±0.33	6.01 ±2.01	0.56 ±0.19	1.22 ±0.28	0.19 ±0.14
	2	2.18 ±0.45	7.69 ±1.44	0.94 ±0.42	1.27 ±0.18	0.23 ±0.11
	4	2.23 ±0.26	10.50 ±3.66	1.34 ±0.46	1.35 ±0.31	0.28 ±0.09
	6	2.43 ±0.55	11.21 ±1.99	1.36 ±0.25	1.46 ±0.24	0.27 ±0.14
	8	2.33 ±0.38	11.30 ±2.93	1.23 ±0.21	1.44 ±0.30	0.30 ±0.12

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* middle-aged

表 3　两组病人 T 细胞亚群比率与 $CD14^+$ 单核细胞 HLA-DR 表达水平变化（$n=31, \bar{x} \pm s$）

Tab 3　The rate of T cells subgroup and the expression of lymphomonocyte $CD14^+$ HLA-DR（$n=31, \bar{x} \pm s$）

Group	On admission (d)	$CD4^+/CD8^+$	Th1/Th2	Rate of CD14 (%)	Expression of $CD14^+$ HLA-DR (%)
Elderly	0	1.27 ±0.33 *	17.55 ±11.99	6.55 ±1.04	45.15 ±7.57
	2	1.38 ±0.35 *	16.42 ±8.75	5.89 ±1.47 *	39.33 ±11.04
	4	1.19 ±0.11 **	12.10 ±4.43	6.33 ±2.55	32.29 ±9.18 *
	6	1.26 ±0.48 *	7.48 ±5.09 **	6.47 ±1.09	33.81 ±13.53
	8	1.14 ±0.32 *	6.66 ±4.68 *	6.33 ±2.58	30.04 ±14.58 *
Middle-aged	0	1.21 ±0.15	19.01 ±12.75	5.92 ±2.27	43.35 ±16.20
	2	1.35 ±0.20	17.42 ±13.17	4.67 ±2.90	41.44 ±18.06
	4	1.43 ±0.36	15.40 ±8.56	7.14 ±2.49	37.69 ±7.53
	6	1.41 ±0.41	12.23 ±8.49	6.30 ±1.99	36.44 ±11.00
	8	1.33 ±0.28	10.77 ±7.51	6.48 ±1.60	37.80 ±11.73

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* middle-aged

3　讨论

严重创伤后病人免疫状态并非一成不变，以全身性炎症反应综合征（systemic inflammatory response syndrome）为特征的早期免疫激活阶段的持续可使机体转入免疫麻痹，出现代偿性抗炎反应综合征（CARS），并导致对病原体抵抗力降低和脏器功能不全的发生。已知致伤原因、损伤危重度和遗传特征等因素可造成机体创伤后免疫抑制程度的差异，而年龄因素是否与此有关尚不清楚。由于老年人往往自身即存在免疫力低下，遭遇创伤则可能进一步加剧了免疫功能紊乱，且这一人群在创伤后感染与多脏衰竭发生率更高，因此有理由推测在严重创伤后老年人表现出的免疫抑制更为严重。

通过本研究我们发现老年人和青中年人在创伤早期补体系统的主要蛋白 C3、C4 和其经典途径激活所需免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 均处于较低水平，但在 2～8 d 上述指标即可恢复正常，两组对比无显著差异。我们推测伤后补体与免疫球蛋白的降低主要由于血容量丧失、血管通透性增加和早期免疫激活后的消耗等，体液免疫功能的改变并非创伤后免疫抑制的成因。老年人蛋白合成能力的下降可能与创伤后免疫麻痹程度加重无关。

$CD14^+$ 单核细胞 HLA-DR 表达作为免疫功能评价指标，被认为与严重创伤病人脓毒症的发病和预后直接相关[2 3 4]。HLA-DR 表达是单核细胞具备抗原识别和递呈能力的重要标志，在单核细胞表面，HLA-DR 座位编码人Ⅱ类区域的主要表达产物，而结合Ⅱ类组织相容复合物（MHC Ⅱ）的 $CD4^+$ T 淋巴细胞向 Th1 或 Th2 不同亚群分化直接调节机体促炎/抗炎平衡。我们在研究中观察到严重创伤后 2～8 d 内病人可呈现 Th1 向 Th2 漂移趋势；老年组这一变化明显，并同时伴有 $CD4^+$、$CD14^+$ HLA-DR 表达下调。由此证实老年人确实存在更为显著的创伤后免疫抑制，而创伤后单核－T 淋巴细胞免疫调控体系的功能变化在两年龄组中可能存在差异。

创伤后早期炎症反应阶段发生的“细胞因子风暴”被认为是造成伤后免疫抑制的重要原因。促炎介质如 TNF-α、IL-6 等在体内持续存在可体现出一定的抗炎作用，而由促炎介质诱生的晚期炎性介质如 IL-10 等则直接具有抗炎活性。Giannoudis 等[5]证实创伤病人 IL-10 的释放下调了 $CD14^+$ HLA-DR 表达，并导致伤后感染和脓毒症的发生。另一项研究表明接受急诊手术的严重创伤病人 TNF-α 与 IL-10 水平与免疫抑制程度相一致[6]。我们对比了两组病人 TNF-α、IL-6、IL-10 及 CRP 血清浓度，发现老年人创伤后促炎与抗炎细胞因子水平在伤后早期要低于中青年人，但持续上升时间延长，反应出老年人代谢缓慢、血清炎性介质清除不利的特征，极有可能是造成两年龄段人群免疫抑制程度差异的重要原因。是否可针对这一特征而适当给予免疫调理治疗或血液净化治疗值得进一步研究。

参考文献：

[1] 曹云新，金伯泉，韩卫宁. CD3/CD8 设门在 FCM 检测 Th1/Th2 亚型中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2002，18(6)：638－639.

[2] Hershman M J, Cheadle W G, Wellhausen S R, *et al*. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient[J]. Br J Surg, 1990, 77(2): 204－207.

[3] Heinzelmann M, Mercer Jones M, Cheadle W G, *et al*. CD14 expression in injured patients correlates with outcome[J]. Ann Surg, 1996, 224(1): 91－96.

[4] Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, *et al*. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma[J]. Ann Surg, 1999, 229(2): 246－254.

[5] Giannoudis P V, Smith R M, Perry S L, *et al*. Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis[J]. Intensive Care Med, 2000, 26(8): 1076－1081.

[6] Flohe S, Lendemans S, Schade F U, *et al*. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients[J]. Intensive Care Med, 2004, 30(1): 96－102.

（编辑　陈聪连）