论著

文章编号:1000-5404(2008)21-1994-04

创伤患者外周血单核细胞自噬变化的研究

余 剑[1],曹红卫[2],梁华平[3],张连阳[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,重庆 400042,[2]西南医院中心实验室,重庆 400038,[3]大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 研究创伤患者外周血单核细胞的自噬变化。**方法** ①根据损伤严重度评分(injury severity score,ISS)或简明损伤定级标准(abbreviated injury scale,AIS)将创伤患者分为轻度创伤组、中度创伤组、严重创伤组,同时设立健康对照组,分别于创伤后24 h、3、5、10 d采集外周血,采用密度梯度离心结合贴壁分离法分离创伤患者外周血单核细胞,应用激光共聚焦显微镜和透射电镜观察细胞自噬现象。②将分离得到的单核细胞进行MDC染色并裂解,应用荧光分光光度计(激发光波长380 nm、发射光波长525 nm)测定荧光强度进行定量分析。③于创伤后24 h、3、5 d检测患者血糖水平,分析创伤后自噬与血糖的相关性。**结果** 与健康对照组相比,创伤患者外周血单核细胞自噬水平明显升高($P<0.01$),创伤后外周血单核细胞自噬水平与创伤程度成正比,与创伤后血糖呈正相关(轻度创伤组:$r=0.962$,中度创伤组:$r=0.928$,重度创伤组:$r=0.973$,$P<0.05$)。**结论** 创伤后通过调节单核细胞自噬水平,使机体免疫功能得到恢复,从而改善预后。

关键词: 自噬;创伤;单核细胞;糖代谢
中图法分类号: R329.25; R331.14; R641.02 **文献标识码:** A

Autophagy of peripheral monocytes following trauma: study on 51 cases

YU Jian[1], CAO Hong-wei[2], LIANG Hua-ping[3], ZHANG Lian-yang[1] ([1]Trauma Center, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Central Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the change of monocyte autophagy in patients after trauma. **Methods** ①According to Injury Severity Score (ISS) or Abbreviated Injury Scale (AIS), we divided our 51 subjected trauma patients into 3 groups, the minor injury group ($n=21$), the moderate trauma group ($n=19$) and the severe trauma group ($n=11$). Another 14 healthy volunteers served as control. We collected the peripheral blood in 24 h, 3, 5 and 10 d after trauma, then harvested the monocytes by density gradient centrifugation with adherence separation. Then we observed the autophagy phenomenon by using laser confocal microscopy and transmission electron microscopy; ② After the isolated monocytes were dyed with MDC and lysed, they were detected and quantified for fluorescent intensity by fluorospectrophotometer (excitation wavelength 380 nm and emission wavelength 525 nm); ③Blood sugar level of all patients were measured in 24 h, 3 and 5 d respectively after trauma, and the correlation between autophagy and blood sugar was analyzed. **Results** Compared with control group, more autophagy in monocytes was observed and quantified in trauma patients than in health volunteers ($P<0.01$). **Conclusion** Autophagy in monocytes is associated with the severity of trauma, and has a positive correlation with blood sugar.

Key words: autophagy; trauma; monocytes; glycometabolism

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象[1-4],细胞在饥饿状态下,会消化自己体内的细胞质来渡过难关。这一过程,生物学上称之为"细胞自噬"。自噬被看作是细胞内环境稳定的看家机制,因此,自噬水平的改变将影响细胞乃至机体的功能。创伤后机体处于高代谢低合成,出现能量相对不足状态。创伤对机体产生多方面的影响,但创伤后自噬水平是否发生改变以及该变化与创伤后血糖有何关系至今尚少见报道。鉴于单核细胞在创伤后的免疫调节中具有重要作用,因此,

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602);国家自然科学基金(30772253)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522602) and the National Natural Science Foundation of China (30772253)
作者简介:余 剑,男,四川省内江市人,硕士研究生,医师,主要从事严重创伤方面的研究。电话:(023)68757993,E-mail:yujianman@sina.com
通信作者:张连阳,电话:(023)68757991, E-mail:hpzhangly@163.com
梁华平,电话:(023)68757404, E-mail:huaping_liang@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-06-06;修回日期:2008-07-15

本实验以此为突破口来探讨创伤患者外周血单核细胞自噬水平有无变化以及该变化与创伤后血糖的关系。

1　资料与方法

1.1　研究对象

选择 2007 年 11 月至 2008 年 1 月入住本院创伤科和重庆市急救中心创伤科的创伤患者,将有基础免疫疾病、含白细胞的血液输注、免疫调节治疗等影响机体免疫功能变化者以及标本收集中出现溶血、凝血或因其他原因在治疗过程中离开医院的患者剔除后共 51 例,其中男性 39 例,女性 12 例,年龄 16 ~ 84 岁,平均 43.1 岁。创伤原因:交通事故伤 29 例(56.9%),坠落伤 9 例(17.6%),刀砍(刺)伤 8 例(15.7%),重物砸伤 5 例(9.8%)。主要受伤部位:颅脑损伤 18 例,其中脑挫裂伤 12 例,颅骨骨折 6 例,18 例中有 5 例伴有颅内出血;胸部伤 19 例,其中肋骨骨折 13 例,血气胸 3 例,严重肺挫裂伤 3 例;腹部损伤 12 例,其中肝脏裂伤 2 例,脾脏损伤 3 例,小肠损伤 3 例,胰腺损伤 1 例,肾脏损伤 3 例;骨盆骨折 5 例;脊柱损伤 6 例;四肢伤 35 例。所有患者均接受了早期急诊处理,其中 30 例早期(一般在伤后 1 ~ 2 h)行确定性手术,21 例因伤情危重而行损害控制手术,术后予以 ICU 监护治疗。

根据损伤严重度评分(injury severity score,ISS)或简明损伤定级标准(abbreviated injury scale,AIS),将患者分成轻度、中度和严重创伤 3 组:轻度创伤组(多发伤 ISS < 16 或部位伤 AIS = 1 ~ 2)21 例;中度创伤组(16 ≤ ISS < 25 或 AIS = 3)19 例;严重创伤组(ISS ≥ 25 或 AIS ≥ 4)11 例。分别于创伤后 24 h 内、3、5、10 d 采集外周血。

同时设立健康对照组 15 例(男性 9 例,女性 6 例),平均年龄 42.1 岁,为本院健康志愿者。

1.2　主要试剂和仪器

完全培养基包括 RPMI1640、10% 小牛血清、淋巴细胞分离液(1.077 ± 0.001)g/ml(中国医学科学院生物工程研究所),丹(磺)酰戊二胺(monodansylcadaverin,MDC)(Sigma 公司产品),LSM 510 META 激光共聚焦荧光显微镜(德国,Zeiss),多功能酶标仪(Bio-TEK Synergy HT,美国),H-7500 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

1.3　方法

1.3.1　外周血单核细胞的分离　　所有受试者无菌取外周静脉血 10 ml,采用密度梯度离心结合贴壁分离法分离外周血单核细胞。①在离心管中加入 5 ml 淋巴细胞分离液。②去肝素抗凝静脉血与等量的不含小牛血清的 IMDM 充分混匀(1∶1),用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上,加入 8 ml 混匀静脉血。水平离心机 400 × g 离心 30 min。③离心后管内分为 3 层,上层为血浆和 IMDM,下层为红细胞和粒细胞。中间层为淋巴细胞分离液,上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带。单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞。④用毛细吸管插到云雾层,吸取单个核细胞。置于离心管中加入 5 倍以上的 D-Hanks 液 300 × g 离心 10 min,洗涤细胞 2 次。⑤计数细胞并配制成 $1 \times 10^6 ml^{-1}$ 的细胞数,以 3×10^6 个细胞接种于直径为 9 cm 的平皿中。⑥37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 1 ~ 2 h,贴壁的则为单核细胞。经流式细胞仪检测,证实贴壁细胞中单核细胞($CD14^+$)浓度 > 92%。

1.3.2　透射电镜检测　　用胰酶将贴壁的单核细胞消化游离,收集单核细胞悬液,300 × g 离心 5 min,共 2 次,吸去上清,2.5% 戊二醛和 1.9% 锇酸双重固定、丙酮逐级脱水、树脂包埋、LKB 型切片机做超薄切片,切片厚度为 50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,H-7500 型透射电镜观察、摄片。

1.3.3　MDC 染色后激光共聚焦显微镜观察　　将分离的单核细胞以 PBS 悬浮,加入能特异标记细胞自噬小体的荧光标记物 MDC,终浓度为 0.05 ~ 0.1 mmol/L,作用 10 ~ 30 min,洗涤细胞,4% 多聚甲醛固定,激光共聚焦荧光显微镜观察自噬小体并照相。

1.3.4　MDC 染色后荧光强度测定　　将 MDC 染色后的单核细胞用细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl,1% Triton X-100,pH = 7.5)裂解细胞,以荧光分光光度计(激发光波长 380 nm、发射光波长 525 nm)测定吸光度值,并进行定量分析。

1.3.5　血糖测定　　在创伤后 24 h、3、5 d,采用葡萄糖氧化酶生化分析仪法(GOD 法)分别检测患者血糖值。

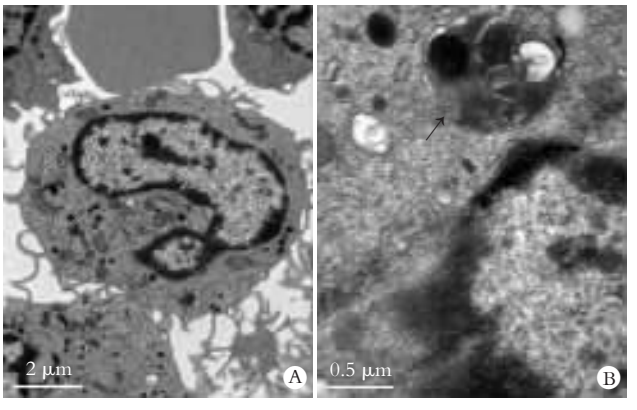
1.4　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 13.0 对吸光度值行单因素方差分析,对血糖值行相关分析。

2　结果

2.1　创伤后外周血单核细胞自噬现象的电镜观察

选择 1 例健康志愿者和 1 例中度创伤患者(ISS = 19,41 岁,男性),分离外周血单核细胞,通过透射电镜观察,发现在创伤患者的单核细胞中具有双层膜结构的自噬体,位于细胞核旁,呈圆形或椭圆形,其内包含细胞质或细胞器(图 1)。

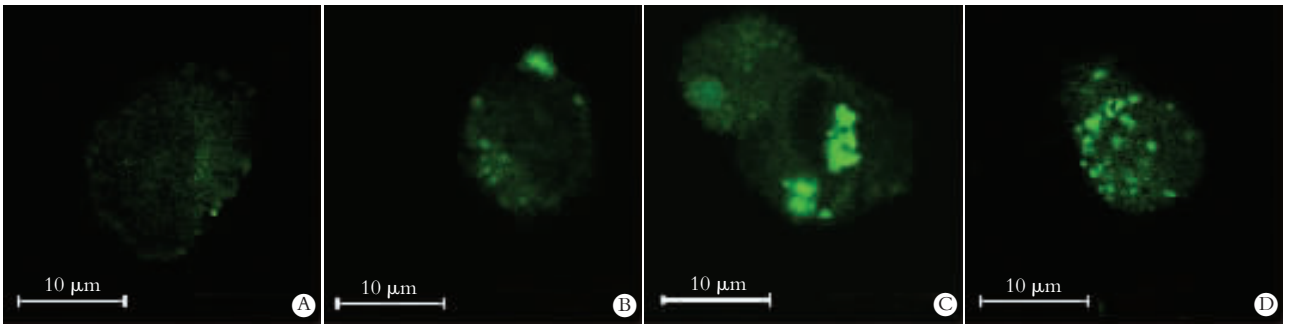


A:健康对照组;B:中度创伤患者伤后 3 d　↑:自噬体

图 1　外周血单核细胞透射电镜观察结果

2.2　创伤后外周血单核细胞 MDC 染色后激光共聚焦显微镜观察

对轻、中、重度创伤患者及健康者各选 1 例,将分离得到的单核细胞以 MDC 染色后,通过激光共聚焦显微镜观察,发现创伤患者单核细胞荧光颗粒(染色的自噬小体)明显比正常对照组增多,且创伤程度越重越明显(图 2)。



A:健康对照组; B:轻度创伤患者伤后3 d; C: 中度创伤患者伤后3 d; D:严重创伤患者伤后3 d

图2 外周血单核细胞MDC染色后激光共聚焦显微镜观察结果

2.3 外周血单核细胞MDC染色后吸光度值比较

与健康对照组比较,创伤患者单核细胞MDC染色后吸光度值(相当于自噬水平)明显升高,并和创伤严重度成正比。轻度创伤患者单核细胞自噬水平一般在第5天达到高峰;中度创伤患者单核细胞自噬水平一般在第3天达到高峰;严重创伤患者单核细胞自噬水平一般在创伤后24 h内达到高峰,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,表1)。

表1 不同创伤程度患者单核细胞自噬水平的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	伤后24 h	伤后3 d	伤后5 d	伤后10 d
轻度创伤组	0.065±0.014	0.089±0.018	0.106±0.031^{a}	0.073±0.025
中度创伤组	0.104±0.031^{bc}	0.129±0.033^{bc}	0.112±0.036^{b}	0.085±0.025
严重创伤组	0.146±0.059^{bcd}	0.138±0.056^{bc}	0.126±0.055^{b}	0.113±0.065^{a}

健康对照组:(0.052±0.002);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$, 与健康对照组比较; c:$P<0.01$,与轻度创伤组比较; d:$P<0.01$,与中度创伤组比较

2.4 不同创伤程度患者自噬水平与血糖的关系

与正常血糖水平比较,创伤后血糖升高,表现为创伤后高血糖症(表2)。对自噬水平和创伤后血糖作相关分析发现创伤后高血糖症越严重,自噬水平升高越明显,二者成正相关(轻度创伤组:$r=0.962$,中度创伤组:$r=0.928$,重度创伤组:$r=0.973$,$P<0.05$)。

表2 不同创伤程度患者血糖水平的变化(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	伤后24 h	伤后3 d	伤后5 d
轻度创伤组	6.18±1.26	5.32±1.13	5.24±1.02
中度创伤组	8.08±2.01	7.51±3.75	6.43±1.86
严重创伤组	8.87±2.44	7.84±2.32	7.35±2.07

健康对照组:(4.25±1.21)mmol/L

3 讨论

自1962年Ashford和Porten发现自噬现象至今已近半个世纪,但随着近10年分子生物学的发展,有研究者在酵母中发现了参与自噬的分子机制,随后在哺乳动物细胞中也发现相似的机制,对自噬的研究才有了重要进展。

自噬作用主要是通过膜包裹需降解物形成自噬体,借助溶酶体降解途径清除降解细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器、以及不再需要的生物大分子等,降解产物可作为新合成蛋白质和细胞器的原料。研究证实,自噬对蛋白质和细胞器的降解作用在生物体正常发育及对某些环境胁迫的响应极为关键,对防止某些疾病如心肌炎、肿瘤、神经退行性疾病等以及对延缓衰老、延长寿命和抵御病原微生物侵袭有积极作用[5-7]。

单核细胞是防御某些细胞内微生物的主要系统,能有效清除受损伤或死亡的细胞及碎片,并参与抗原处理和免疫应答。由于抗原呈递细胞(包括单核细胞)的自噬被认为是机体对应激和炎症响应的保护机制[8],因此创伤后单核细胞自噬水平的升高对机体应有保护作用。但是,创伤后自噬水平并不是越高对机体就越有利,对有凋亡缺陷的细胞,自噬可促进其坏死,从而避免无限制的扩增[9]。在应激状况下,自噬水平适当增高可抑制细胞凋亡,从而有利于细胞存活;另一方面,自噬水平过度升高,使细胞内大量的细胞质和细胞器过快被降解,从而导致细胞易于死亡[10,11]。

在本实验中,电镜结果从形态学上证实了单核细胞自噬现象的存在,另外我们通过激光共聚焦显微镜结果和单核细胞MDC染色后吸光度值,分别定性和定量证实了创伤后外周血单核细胞自噬水平发生了变化,并且创伤程度越重,单核细胞自噬水平升高越显著。在本组资料51例创伤患者中,无死亡病例,轻伤组无并发症发生;中度创伤组有1例伤口感染;严重创伤组伤口感染1例,肺部感染2例。提示创伤后单核细胞自噬水平的过度升高可能导致其抗原呈递功能失衡,从而使机体免疫功能低下或紊乱,引起感染、多器官功能障碍综合征、全身性炎症反应综合征等并发症,影响预后,但由于病例收集数不够多,其确切关系还有待进一步研究。

创伤后糖代谢通过胰高糖素、胰岛素等激素调节,同时葡萄糖载体作用受抑制,糖利用受限,血糖清除率异常,从而表现为高血糖症,胰岛素/胰高糖素比例下降,可导致血糖升高,而胰岛素强化治疗能明显改善严重创伤后免疫功能, 增强单核细胞噬菌能力[12]。研究证实,胰岛素可抑制自噬,胰高糖素可促进自噬,创伤后胰岛素水平下降,同时单核细胞表面胰岛素受体

数目减少,因此促进了单核细胞自噬水平的升高[13]。在本实验中,创伤程度越重,患者高血糖症越明显,单核细胞自噬水平升高越显著。我们推测认为,创伤后外周血单核细胞自噬水平与血糖虽然在一定程度上成正比,但不直接相关,而是与胰岛素/胰高糖素密切相关,但由于本实验尚未检测胰岛素、胰高糖素水平,其确切的关系有待于在下一阶段研究中予以阐明。

因此,在创伤状态下,发生自噬的潜在生物学意义在于通过体外调节创伤后抗原呈递细胞(包括单核细胞)的自噬水平,逆转或缓解其抗原呈递功能失衡,从而恢复机体的免疫功能,减少并发症,改善预后。

参考文献:

[1] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990 - 995.

[2] Schmid D, Dengjel J, Schoor O, *et al*. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens[J]. J Mol Med, 2006, 84(3): 194 - 202.

[3] Deretic V. Autophagy in innate and adaptive immunity[J]. Trends Immunol, 2005, 26(10): 523 - 528.

[4] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense[J]. Cell, 2005, 120(2): 159 - 162.

[5] Huang J, Klionsky D J. Autophagy and human disease[J]. Cell Cycle, 2007, 6(15): 1837 - 1849.

[6] Ventruti A, Cuervo A M. Autophagy and Neurodegeneration[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007, 7(5): 443 - 451.

[7] Levine B. Cell biology: autophagy and cancer[J]. Nature, 2007, 446(7137): 745 - 747.

[8] Heymann D. Autophagy: A protective mechanism in response to stress and inflammation[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2006, 7(5): 443 - 450.

[9] Ullman E, Fan Y, Stawowczyk M, *et al*. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(1): 422 - 425.

[10] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, *et al*. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 741 - 752.

[11] Kessel D, Reiners J J Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage[J]. Photochem Photobiol, 2007, 83(5): 1024 - 1028.

[12] 赵晓东,姚咏明,马俊勋,等. 胰岛素强化治疗对创伤患者免疫球蛋白、补体及单核细胞噬菌能力的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5): 279 - 282.

[13] Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, *et al*. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 8452 - 8459.

(编辑　吴培红)

(上接 1993 页)

在系膜区和毛细血管壁沉积;肌电图提示肌源性损害;左侧腓肠肌活检提示肌纤维变性萎缩伴慢性炎症。诊断为多发性肌炎合并心、肺、肝和肾多脏器损害。给予甲基强的松龙 1.0 g,静脉滴注,1 次/d ×3 次,后改为甲泼尼龙片 40 mg,口服,1 次/d;同时给予来氟米特(商品名爱诺华)40 mg,口服,1 次/d ×3 次,后改为 20 mg,口服,1 次/d。1 周后患者自觉症状减轻。维持治疗 20 d 后临床症状消失,可下床活动。复查尿常规:蛋白(-)、潜血(+-)、RBC 1 ~ 3 个/HP。尿蛋白定量 0.18 g/24 h。肝功:TP 60.6g/L、ALB 30.4 g/L、GLB 30.2 g/L、AST 66.0 U/L、ALT 108.5 U/L、ALP 49.2 U/L、GGT 17.5 U/L、LDH 550.7 U/L;心肌损伤标志物:TNT 0.45 ng/ml、CK-MB 44.01 ng/ml、MYO > 814.2 ng/ml;CK 1 022.9 U/L。患者出院。1 个月后门诊复查,血、尿常规和肝肾功能正常;TNT 0.17 ng/ml、CK-MB 6.82 ng/ml、MYO > 110.6 ng/ml、CK 87.1 U/L。将甲泼尼龙片改为 32 mg,口服,1 次/d;来氟米特 20 mg,口服,1 次/d 维持。第 2 个月复查,全部指标正常,停用来氟米特,甲泼尼龙片每周撤减 4 mg,直至停用。随访至今(10 个月)未复发。

2　讨论

多发性肌炎(polymyositis,PM)是一组累及骨骼肌的、以肌间质性炎变和肌纤维变性为主要特点的综合征,表现为近端肢体、颈部及吞咽肌无力,可伴有肌痛及肌萎缩,并且可合并肾、肺、心和肝等多脏器损害等多个脏器[1-3],国内叶明等[2]报道过 1 例 PM 同时合并肺、肾损害的病例;国外类似病例也少见报道[3],其中合并肾脏损害的病例更为少见,像本病例这样同时合并 4 个脏器损害的 PM 实属罕见。目前研究表明 PM 合并肾脏损害的唯一病理类型是系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis,mesPGN),伴随免疫球蛋白(如 IgA、IgM 或 IgG)和补体(如 C3 或 C1q)在系膜区、小管或血管壁沉积[3]。本例患者的肾脏损害表现为轻度 mesPGN,伴有 IgM 和 C3 在系膜区和毛细血管壁的沉积。PM 系细胞介导的免疫过程,$CD8^+$ 在肌纤维的聚集促进细胞因子的释放,可能刺激系膜细胞增殖;而 $CD4^+$ 和 B 细胞可激活补体,引起补体在肌肉和肾脏毛细血管沉积,损伤血管内皮,从而导致组织和器官的损害[3]。PM 合并的心、肺和肝脏损害可能存在同样的发生机制,但尚需更多的临床和基础研究证实。糖皮质激素是治疗 PM 的首选药物,但对于合并多脏器损害的 PM 单用激素似乎不能迅速有效的控制疾病进展,往往需要联用细胞毒药物(如环孢霉素 A)和免疫球蛋白[1,3]。我们对本病例使用激素联合来氟米特的治疗方法收到理想的效果,值得临床医师借鉴。

关键词:多发性肌炎;多脏器损害;糖皮质激素;来氟米特
中图法分类号:R593.26　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 刘　芳,蒲传强. 多发性肌炎合并心脏损害误诊为冠心病一例[J]. 中华老年医学杂志,2006,25(9): 705 - 706.

[2] 叶　明,李　涛,李承姜. 多发性肌炎合并肺、肾受损临床分析[J]. 临床内科杂志,2007,24(10): 703 - 704.

[3] Takizawa Y, Kanda H, Sato K, *et al*. Polymyositis associated with focal mesangial proliferative glomerulonephritis with depositions of immune complexes[J]. Clin Rheumatol, 2007, 26(5): 792 - 796.

(编辑　邓强庭)