DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.021

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-0996-03

外伤性持续植物状态病人非特异性免疫功能的损害及意义

陈 健[1],周定标[1],郑文济[2] ([1]解放军总医院神经外科,北京 100853;[2]北京军区总医院神经外科,北京 100700)

提 要:目的 通过检测HLA-DR在外周血单核细胞表面的表达水平,了解脑外伤后持续植物状态(PVS)病人的免疫功能变化情况。方法 应用密度梯度离心法将实验组即PVS病人及正常对照组的外周血单核细胞分离出来,然后应用酶联免疫法检测外周血单核细胞受IFN-r或LPS刺激后,其所表达的HLA-DR的变化水平。结果 和正常对照组相比,脑外伤后PVS病人外周单核细胞表面HLA-DR的表达水平明显下降($P<0.001$)。实验组及对照组的外周血单核细胞经IFN-r或LPS共孵育刺激后,其HLA-DR的表达水平皆有显著升高($P<0.01$),但对脑外伤后PVS病人来说,其HLA-DR的表达仍难以恢复到正常水平($P<0.05$)。结论 脑外伤后持续性植物状态病人的免疫功能明显受到抑制。

关键词:持续植物状态;HLA-DR;免疫;脑外伤
中图法分类号:R392.3;R741.04;R749.12 文献标识码:A

Impairment of non-specific immunity in patients under persistent vegetative state resulted from trauma

CHEN Jian[1], ZHOU Ding-biao[1], ZHENG Wen-ji[2] ([1]Department of Neurosurgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853; [2]Department of Neurosurgery, General Hospital of Beijing Military Area Command, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To investigate the immune response in patients in persistent vegetative state (PVS) resulted from brain injury by measuring the level of HLA-DR antigen expression on the surface of peripheral blood monocytes. Methods Peripheral blood monocytes were obtained from PVS patients and normal control group by density gradient centrifugation. The enzyme linked immunosorbent assay kits were then used to measure the changes in level of the monocyte HLA-DR antigen expression before and after monocytes activated with either IFN-r or LPS. Results Compared with the normal control group, the peripheral blood monocyte HLA-DR antigen expression fell significantly in PVS patients ($P<0.001$), and the level of HLA-DR antigen expression on the monocyte surface of both groups all rose notably after stimulation with either IFN-r or LPS ($P<0.01$), but it was still difficult for that of the PVS patients to restore to normal level ($P<0.05$). Conclusion The function of non-specific immunity in patients in persistent vegetative state resulted from brain injury is suppressed.

Key words: persistent vegetative state; HLA-DR; immunity; brain injury

随着现代医疗水平的提高,严重脑外伤所引起的病死率已有明显下降,但因此而致外伤后持续植物状态(persistent vegetative state, PVS)的发生率却没什么变化。流行病学调查显示,严重脑外伤后PVS的发生率为10%~14%。PVS病人最常见的死亡原因是由于各种感染如肺炎、泌尿系感染所致的并发症[1,2]。一般认为创伤及大的外科手术后,机体的免疫抑制是感染好发的重要原因。但这些免疫功能检测指标中与感染及死亡等预后结果密切相关的却很少。有研究表明以下两个因素对预后的判定有特别重要的意义:一个是外周血单核细胞表面HLA-DR的表达水平,另一个是血清调理素对中性粒细胞吞噬异物的调理能力[3,4]。因此在本研究中,我们对外伤性PVS病人外周血单核细胞表面人白细胞抗原DR (HLA-DR)的表达水平进行了检测,并观察IFN-r或LPS对其表达的影响,由此反映外伤性PVS病人的免疫受抑制情况及对预后的影响。

1 资料与方法

1.1 病例收集

根据美国PVS多学科协会制定的PVS诊断标准,我们共对12名外伤性PVS病人进行了检测,所有病人都来自北京军区总医院神经外科,8男4女,平均年龄38.58岁,(年龄范围19~62岁);所有病人的一般情况稳定。12个健康志愿者作为对照组,

作者简介:陈 健(1971—),男,湖南省沅陵县人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤及脑血管病方面的研究。电话:(010)68230961

收稿日期:2003-06-16;修回日期:2003-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

他们的年龄与性别比与 PVS 组相匹配。

为了确定最佳的刺激剂量和共孵育刺激时间, 对 4 个健康志愿者的外周血单核细胞样品做剂量-浓度关系测定。采取各实验对象的外周静脉血 4~5 ml, 用不含内毒素但含 EDTA 钠盐抗凝的试管收集。

1.2　样品处理

1.2.1　外周血单核细胞的分离　　用肝素抗凝管收集外周静脉血标本 5 ml。利用淋巴细胞分离液(北京邦定公司)将标本离心分层(2 500 r/min, 30 min), 弃上清, 得单个核细胞。将沉淀好的单个核细胞用 RPMI1640 (北京中山公司)培养液制成悬液。将制备的细胞悬液放入较大的培养皿中(直径约 12 cm), 37 ℃静置 30~60 min。根据单核细胞的贴壁性, 将未贴壁细胞倾出, 用 Hanks 溶液强力冲洗吹打与振荡, 将贴壁的单核细胞冲落, 收集到试管中, 利用 2%台盼蓝溶液计数活细胞, 将收集到的单核细胞悬液浓度配为每高倍镜视野下 3~4 个为标准, 留待备用。

1.2.2　单核细胞对白色念珠菌的吞噬及杀灭作用　　取白色念珠菌(军事医学科学院五所)新生菌落半个, 在 0.5 ml 0.9% 生理盐水中混悬(菌数约 3×10^6 个)加至盛有单核细胞的试管中混合, 加塞, 37 ℃温育 45 min, 取出后离心 10 min, 弃上清液, 混匀沉淀物, 取一滴置载玻片上。加 0.2 g/L 亚甲蓝溶液 1 滴, 混匀, 覆以盖玻片, 5 min 后, 用油镜观察, 染成蓝色者为死菌, 未着色者为活菌, 计数 100 个单核细胞中吞噬有着色及未着色细菌的细胞数即分别为杀菌率和吞噬率。

1.2.3　剂量-反应曲线　　将获得的健康志愿者的单核细胞样品在 37 ℃与剂量浓度为 50、100、200、400 U/ml 的 IFN-r 或剂量浓度为 50、100、200、400 ng/ml 的 LPS 共孵育 0、60、120、240 和 480 min, 应用仅含相同体积的 PBS 液作对照, 通过 ELISA 检测单核细胞表面 HLA-DR 的表达水平。根据所得到的不同 HLA-DR 表达值, 作出剂量-反应曲线。根据曲线所示, 可以看出 IFN-r 的最佳刺激浓度为 200 U/ml 最佳孵育时间为 240 min; LPS 则为 100 ng/ml 及 240 min。由此得到的剂量浓度和孵育时间将应用于正式的实验研究中。

1.3　HLA-DR 表达的检测

根据文献介绍用 ELISA 法检测外周血单核细胞表面 HLA-DR 的表达。简述如下, 应用 Hypaque-Ficon 液在 2 500 r/min 离心 30 min 从外周血中分离出单个核细胞, 根据单核细胞对塑料的粘附性, 从单个核细胞中分离出单核细胞。在一定条件下, 分离出的单核细胞依次分别与抗人 HLA-DR 单抗(中山公司, 北京), SA-HRP 及生物素化羊抗鼠 IgG(中山公司, 北京)孵育一定时间。以培养液作为交叉对照调零, HLA-DR 的表达水平以酶联仪测 A_{490} 值表示。

1.4　统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以两组均数 t 检验行组间比较。

2　结果

外伤后 PVS 组患者外周血单核细胞对白色念珠菌的吞噬率为(56.5±20.2)%, 杀菌率为(13.4±5.8)%, 而对照组分别为(91.7±2.9)%及(33.8±4.2)%, 差异非常显著($P<0.01$)。由此可见外伤后 PVS 患者外周血单核巨噬细胞对外来病菌的清除率明显下降。

在单核细胞被刺激前, 外伤后 PVS 组病人外周血单核细胞 HLA-DR 的表达值为 0.193~0.034, 对照组为 0.515~0.045, 两组间存在非常显著性差异($P<0.01$)。

由图 1 可看出, IFN-r 或 LPS 对外周血单核细胞 HLA-DR 的表达有明显的影响。在外周血单核细胞与 IFN-r 200 U/ml 或 LPS 100 ng/ml 共孵育刺激 240 min 后 PVS 组 HLA-DR 的表达水平上升至(0.34±0.089)或(0.344±0.075), 和刺激前水平比较, 差异显著($P<0.01$)。同样条件下, 对照组外周血单核细胞 HLA-DR 的表达亦增至(1.104±0.117)或(1.052±0.135), 增长明显($P<0.01$)。对刺激后两组间 HLA-DR 的表达水平进行比较, 发现同样存在非常显著性差异($P<0.01$)。而且, 虽经 IFN-r 或 LPS 刺激, PVS 组外周血单核细胞 HLA-DR 的表达水平仍难以恢复至正常水平($P<0.05$)。

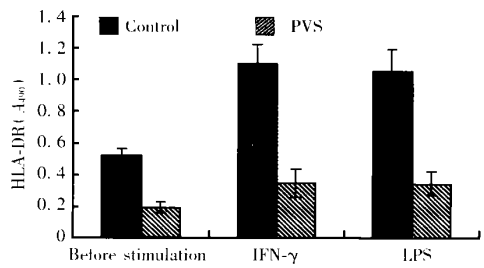


图 1　外周血单核细胞 HAL-DR 表达的比较

Fig 1　Level of HLA-DR antigen expression on the surface of peripheral blood monocytes

IFN-r 或 LPS 对外周血单核细胞 HLA-DR 表达的促进率(即经孵育刺激后 HLA-DR 表达增长的百分比)在 PVS 组为(80.6±55.6)% 或(71.1±43.5)%, 而在正常对照组则为(114.4±26.4)%或(105.2±30.5)%, 两组间存在明显差异($P<0.05$), 如图 2。

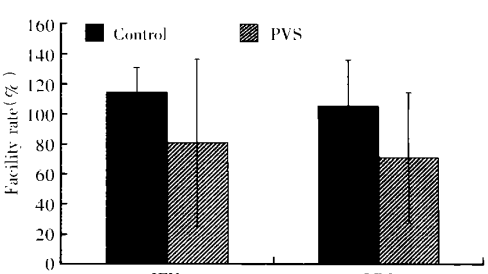


图 2　刺激对外周血单核细胞 HLA-DR 表达的促进率

Fig 2　Facility rate of INF-γ or LPS on the monocyte HLA-DR antigen expression

3　讨论

研究表明, 创伤后免疫系统往往是受到压抑的, 这

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

被认为是创伤或较大的手术后并发感染及败血症的一个重要原因。脑创伤亦不例外[5]。外伤后PVS病人除CNS受到严重损伤外,还有一个重要特点,即丧失了精神意识活动。近来,通过对情绪、应激及精神疾病的免疫研究,也证实了神经-内分泌-免疫系统间的紧密联系。本实验通过观察外伤后PVS病人外周血单核细胞对白色念珠菌的吞噬和杀灭作用,发现免疫细胞的杀菌和抑菌作用明显降低,正由于临床上PVS病人免疫功能受到抑制,所以该类病人感染的发生率高,这要求在临床治疗和护理上特别引起注意,尽量做到无菌操作,防止感染,提高病人的免疫力。

MHC二类抗原在免疫系统中具有很多功能,其中很重要一项即是参与辅助细胞如单核细胞或巨噬细胞等对抗原的递呈作用,如没有这样的过程,机体将不能产生有效的免疫应答。因此,理论上PVS病人单核巨噬细胞表面HLA-DR的表达水平对临床感染的产生具有影响,因为MHC二类抗原的表达失败将导致抗原递呈的失败。人外周血单核细胞MHC二类基因D区的产物包括DR,DP,及DQ抗原,它们都可诱导产生,但在单核细胞中以DR抗原的表达最为常见。在几项研究中表明,外周血单核细胞中阳性表达HLA-DR的百分比、单核细胞表面HLA-DR的表达密度、创伤后HLA-DR表达的恢复能力以及恢复的时间和程度都将直接影响病人的预后结果,它包括感染的发生、发展及感染是否导致死亡[3,6~8]。在本研究中,我们发现与正常对照组相比,PVS组病人外周血单核细胞HLA-DR的表达水平明显下降,且这种低水平长期存在难以恢复,在很多情况下,甚至根本不恢复。因此,这在一定程度上有助于解释为什么PVS病人的感染发生率高,且一旦感染如肺部、泌尿系等,则感染难以控制,大部分病人亦死于该类感染引起的并发症。但具体什么机制导致单核细胞表面HLA-DR表达的下调及创伤后为什么长期难以恢复尚不清楚。可能与神经内分泌免疫系统的调节紊乱有关,细节值得进一步研究。

一些细胞因子如IFN-r能减少感染的发生率,它们是通过增强机体的免疫力实现的,这在临床和实验研究中都得到了证实[9]。Klava等[4]通过将全血与IFN-r或LPS共孵育模拟临床条件,发现尽管创伤病人外周血单核细胞HLA-DR的表达上调,但却仍难以恢复至正常水平,说明它们的作用有限。这也解释了为什么临床上预防应用IFN-r的效果要较预期的差。本实验中,我们亦发现PVS病人外周血单核细胞经IFN-r或LPS刺激后HLA-D的表达虽明显上调,但和正常对照组相比,仍差异显著且难以恢复至正常;IFN-r或LPS对PVS病人单核细胞HLA-DR表达的促进率亦低于正常对照组。说明PVS病人的免疫系统受到较严重抑制。因此,我们有理由认为中枢神经系统的高级神经功能活动如意识包括语言理解、自主运动等对免疫调节有重要影响。一旦因严重创伤致高级神经功能丧失,正常的免疫功能亦将受到抑制。IFN-r或LPS在一定程度能促进免疫功能的恢复,但作用有限,需综合措施始能降低感染及感染所致的死亡率。同时,对免疫反应辅助剂的使用剂量和时间尚待积累更多的经验,因为它们的不合理应用同样会导致免疫系统的抑制和受损,甚至加重感染。有研究建议IFN-r的应用时间应尽量长,直至病人康复,如中断太早,单核细胞表面HLA-DR的表达又会再次下调。

因本研究的病例数有限,更确切的结论有待对更多的PVS病人研究后得出。PVS作为疾病的一种特殊形式,如能找到一个较好的切入点,将有助于我们加深对神经-免疫-内分泌之间关系的了解。

参考文献:

[1] Anonymous. Medical aspects of the persistent vegetative state (1). The Multi-Society Task Force on PVS[J]. N Engl J Med, 1994, 330(21): 1499-1508.

[2] Anonymous. Medical aspects of the persistent vegetative state (2). The Multi-Society Task Force on PVS[J]. N Engl J Med, 1994, 330(22): 1572-1579.

[3] 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.

[4] Klava A, Windsor A, Boylston A W, *et al*. Monocyte activation after open and laparpscopic surgery[J]. Br J Surg, 1997, 84(8): 1152-1156.

[5] Wolach B, Sazbon L, Gavrieli R, *et al*. Early immunological defects in comatose patients after acute brain injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94(5): 706-711.

[6] Wolk K, Docke W D, Von Baaehr V, *et al*. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance[J]. Blood, 2000, 96(2): 218-223.

[7] Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, *et al*. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis[J]. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(3): 363-368.

[8] Hershman M J, Appel S H, Wellhausen S R, *et al*. Interferon-gamma treatment increases HLA-DR expression on monocytes in severely injured patients[J]. Clin Exp Immunol, 1989, 77(1): 67-70.

[9] Polk H C Jr, Cheadle W G, Livingston D H, *et al*. A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients[J]. Am J Surg, 1992, 163(2): 191-196.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net