DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.034
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0081-04

论著

创伤-失血性休克对机体免疫功能的影响

刘靖华[1],陈惠孙[2],胡德耀[2],刘良明[2],刘怀琼[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院麻醉科,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要 目的:探讨创伤-失血性休克对机体免疫功能的影响。方法:以大鼠闭合性骨折合并失血性休克为模型,于创伤-失血性休克及其复苏后2 h、1、2、3、7 d处死动物,分离并纯化脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞,检测脾淋巴细胞增殖能力、IL-2释放、IL-2Rα表达和腹腔巨噬细胞的吞噬能力、MHC Ⅱ抗原表达及TNF-α的分泌。结果:①创伤-失血性休克后脾淋巴细胞增殖能力降低,IL-2释放和IL-2R表达减少;②腹腔巨噬细胞的吞噬功能减弱,MHC Ⅱ抗原表达和TNF-α释放减少。上述变化在伤后7 d尚未恢复到正常水平。结论:创伤-失血性休克后机体免疫功能受到广泛影响,淋巴细胞和巨噬细胞的功能受损,并持续较长的时间。

关键词 创伤;失血性休克;免疫
中图法分类号 R605.971;R641 文献标识码 A

Effects of traumatic-hemorrhagic shock on immune function in rats

LIU Jing-hua, CHEN Hui-sun, HU De-yao, LIU Liang-ming, LIU Huai-qiong (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To investigate the effects of traumatic-hemorrhagic shock on immune function. Methods: Splenocytes and peritoneal macrophages were harvested at the 2nd h and on the 1st, 2nd, 3rd and 7th d after the model of closed bone fracture and hemorrhagic shock were established in rats. Then splenocyte proliferation capacity, interleukin 2 release, interleukin 2 receptor expression, peritoneal macrophage phagocytosis, antigen presentation function and TNF-α release were determined. Results: All these indexes were decreased after operation as compared with those in the control group. Conclusion: Traumatic-hemorrhagic shock induces a marked depression of immune function and the alterations persist for at least 1 week.

Key words trauma; hemorrhagic shock; immunity

研究表明,严重创伤或休克后机体的免疫功能处于紊乱状态,使继发感染的发生及其死亡大为增加。但在临床上,严重创伤往往与失血性休克同时发生。创伤合并失血性休克对机体的免疫功能影响程度如何目前鲜见报道。本实验以大鼠失血性休克合并闭合性骨折及复苏为模型,观察了创伤-失血性休克后脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞的变化规律。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar雄性大鼠,体重200~280 g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 模型

乙醚麻醉大鼠后,分别经颈内动脉和颈外静脉插管。插管完毕并待动物清醒后,钳夹折断其右后肢(无明显出血),然后经颈内动脉放血,10 min内使血压下降到(35±5) mmHg。维持60 min后复苏,复苏液为失血及两倍于失血的林格氏液。

1.3 试剂

ConA和LPS(*Escherichia coli*, 0111:B4)购自Sigma公司,小鼠抗大鼠CD25抗体(进口分装)购自北京中山公司,OX_6和OX_{17}(分别为小鼠抗大小I-A和I-E抗原的单克隆抗体)购自Serotec公司,TNF-α检测试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室。

1.4 脾细胞的分离[1]

无菌获取脾脏,用剪刀反复剪切至糊状,然后用不锈钢网筛(100目)滤过。离心1 000 r/min、10 min后弃上清,用低渗休克法溶解红细胞[2]。最后用RPMI 1640培养液悬浮细胞。台盼蓝染色,细胞活力>95%。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L041)
作者简介:刘靖华(1965.5),女,陕西省富平县人,博士,主治医师,主要从事创伤与免疫方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754146
收稿日期:1999-06-29;修回日期:1999-09-28

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

1.5 腹腔巨噬细胞的分离

过量乙醚处死大鼠，腹腔内注入无菌预冷的 PBS 30～50 ml，按摩腹部 1 min，吸出腹腔液，1 000 r/min 离心 10 min，用 RPMI 1640 培养液悬浮细胞，于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养 2 h，洗去未贴壁细胞，轻轻刮下贴壁的巨噬细胞，调细胞浓度为 1×10^6/ml 备用。经瑞氏染色法鉴定 Mφ 细胞纯度 >90%；台盼蓝染色，细胞存活率 >95%。

1.6 脾淋巴细胞增殖能力测定[2]

取无菌制备的大鼠脾淋巴细胞悬液，并调细胞浓度为 1×10^6/ml。于 96 孔无菌培养板内每孔加入细胞液 0.1 ml，含有或不含有 ConA 的 RPMI 培养液 0.1 ml（ConA 终浓度 5 μg/ml），一式三孔。于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养 48 h，加入 ^{3}H-TdR 20 μl（0.25 μCi/ml）/孔，继续培养 16 h。用多头细胞收集仪收获细胞，用液闪仪测其放射性（Bq）。

1.7 IL-2 活性测定（细胞法）[2]

24 孔培养板上每孔加入脾细胞悬液 1 ml，ConA 50 μl（终浓度 10 μg/ml），于 37℃，5%CO_2 培养中培养 24 h，离心。收集的上清－70℃保存，为 IL-2 待测样本；细胞用于 IL-2R 测定。

取生长良好的 CTLL-2 细胞，调细胞浓度为 1×10^5/ml。于 96 孔无菌细胞培养板上每孔分别加入：CTLL-2 细胞 0.1 ml，IL-2 标准样品或待测样本 0.1 ml，于 37℃，5%CO_2 培养中培养 48 h。加入 ^{3}H-TdR 20 μl（0.25 μCi/ml）/孔，继续培养 8 h，以多头细胞收集仪收获细胞测其 B_q 值，并以标准品计算样本中 IL-2 活性。

1.8 IL-2 受体测定（ELISA 法）[3]

于 96 孔培养板（经多聚赖氨酸预处理）中每孔加入细胞悬液 100 μl，于 37℃，5%CO_2 培养箱中培养 4 h 后取出。每孔再加入 0.5%戊二醛 PBS 液 100 μl，固定 1 h 后，PBS 洗 2 遍。然后加入甘氨酸（100 mmol/L）PBS（含 0.1%BSA）溶液 200 μl/孔，室温下 30 min 后弃去甘氨酸溶液，PBS 洗 2 遍。加入封闭液（1% BSA＋1%Tween 20 PBS）100 μl/孔，4℃过夜。PBS 淋洗后加入封闭液稀释的一抗（小鼠抗大鼠 CD25，1∶200）50 μl/孔，室温下 1 h。PBS 淋洗 3 次。然后加入二抗（羊抗小鼠 HPR-IgG，1∶1 000），室温下 1 h。PBS 淋洗 3 次。加入 ELISA 基质液 200 μl/孔，37℃ 15 min 后加入 2 mol/L 硫酸 50 μl/孔终止反应，酶标仪读数。波长为 492 nm。

1.9 腹腔巨噬细胞 MHC Ⅱ类抗原表达的测定[4]

取腹腔巨噬细胞悬液 1 ml，加入 OX6、OX17（荧光素标记）各 10 μl，4℃避光放置 30 min，其间混悬细胞 1 次。用 PBS 洗涤细胞 2 次，上流式细胞仪进行测定。

1.10 TNF-α 的测定

按试剂盒说明书操作。

1.11 腹腔巨噬细胞吞噬能力测定[5]

大鼠腹腔注入 10%鸡红细胞 1 ml，30 min 后处死大鼠，分离腹腔巨噬细胞。吸 0.5 ml 滴于载玻片上，37℃孵育 30 min，用生理盐水洗掉未贴片的细胞，晾干。用 1∶1 丙酮-甲醇液固定，姬姆萨-瑞氏染色液染色，在高倍镜下或油镜下观察计数，计算吞噬率。

$$\text{吞噬率}=\frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞}}{\text{巨噬细胞数（200）}}\times100\%$$

1.12 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 创伤-失血性休克后脾淋巴细胞增殖能力、IL-2 产生及 IL-2Rα 表达的变化

与正常对照组大鼠相比，创伤-失血性休克及其复苏后大鼠脾淋巴细胞对 ConA 刺激的增殖反应显著受损，IL-2 释放减少，细胞膜 IL-2Rα 表达受抑，以伤后第 1 天最为明显（$P<0.01$），在随后几天各项指标缓慢回升，伤后第 7 天仍未恢复到正常水平（$P<0.05$），见表 1。

2.2 创伤-失血性休克后巨噬细胞吞噬功能、MHC Ⅱ抗原表达（I-A、I-E）及 TNF-α 水平的变化

与正常对照组大鼠相比，创伤-失血性休克复苏后巨噬细胞的吞噬能力、MHC Ⅱ抗原表达（I-A、I-E）及其在脂多糖（LPS）刺激下 TNF-α 的分泌均受到显著抑制。其中巨噬细胞的吞噬能力于伤后 2 h 最低（$P<0.01$），2 d 后恢复正常（$P>0.05$）。I-A、I-E 阳性细胞数于伤后 1 d 最少，TNF 的释放于伤后 1 d 最低。伤后第 7 天上述各项指标尚未恢复到正常水平，见表 2。

表 1 创伤失血性休克后脾淋巴细胞功能的变化（$n=6$）

Tab 1 Changes of splenocyte function following trauma-hemorrhagic shock（$n=6$）

Group	Proliferation（×34.8 Bq）	IL-2（U/ml）	IL-2Rα（D_{492}）
Control	5 724.5±438.25	7.83±0.75	0.340±0.027
Post T-HS			
2 h	3 366.5±241.48**	5.15±0.39**	0.226±0.015**
1 d	2 902.0±272.01**	2.13±0.45**	0.129±0.009**
2 d	3 215.5±148.11**	4.46±0.49**	0.071±0.005**
3 d	3 295.8±279.19**	5.45±0.39**	0.115±0.005**
7 d	4 677.5±343.56*	6.76±0.30*	0.311±0.007*

T-HS：Trauma-hemorrhagic shock；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

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

表 2　创伤失血性休克后腹腔巨噬细胞功能的变化($n = 6$)

Tab 2　Changes of peritoneal macrophage function following trauma-hemorrhagic shock($n = 6$)

Group		Phagocytosis(%)	I-A(%)	I-E(%)	TNF-α(U/ml)
Control		33.4 ± 1.76	71.32 ± 1.22	68.77 ± 1.58	281.17 ± 25.6
Post T-HS	2 h	16.13 ± 2.59**	54.43 ± 7.14**	52.32 ± 7.03**	150.67 ± 20.7**
	1 d	28.4 ± 3.18*	38.27 ± 5.99**	35.68 ± 5.97**	130.67 ± 10.2**
	2 d	33.23 ± 4.44	46.71 ± 6.22**	44.02 ± 5.92**	160.83 ± 17.2**
	3 d	31.7 ± 2.69	58.40 ± 3.25**	55.67 ± 3.14**	170.33 ± 22.3**
	7 d	32.15 ± 4.23	63.58 ± 4.55*	60.87 ± 4.70**	168.57 ± 17.2**

T-HS: Trauma-hemorrhagic shock; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ *vs* control

3　讨论

既往的研究多采用单纯创伤 (如开腹、骨折等) 或失血性休克动物模型, 但在临床上创伤与失血性休克往往是密不可分。因此采用创伤合并失血性休克的动物模型更能模拟临床实际情况。本实验发现, 创伤 - 失血性休克后大鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞功能均受到明显抑制, 表现在脾淋巴细胞的增殖能力降低, IL-2 产生及 IL-2Rα 表达减少, 巨噬细胞吞噬功能减弱, MHC Ⅱ类抗原表达受抑, TNF-α 释放减少。其中, 巨噬细胞吞噬功能于伤后 2 h 最低, 48 h 恢复; 其它指标在伤后 24 ~ 48 h 最低, 伤后第 7 天各项指标有所恢复, 但未达到正常水平。以往的研究发现, 单纯失血性休克或创伤动物其免疫功能抑制持续 3 ~ 5 d 恢复正常[6], 而本实验大多数指标在伤后第 7 天仍未恢复正常, 提示创伤复合失血性休克后免疫抑制持续的时间较单纯创伤或失血性休克要长。最近, Xu 等[7] 也发现创伤 (开腹) 合并失血性休克 (30 mmHg 维持 60 min) 后第 7 天大鼠脾淋巴细胞增殖能力及其 IL-4、IL-3 分泌、腹腔巨噬细胞 IL-1、IL-6、TNF-α 的分泌均处于抑制状态, 伤后第 10 天恢复正常, 支持本实验结果。另外, 临床研究也表明, 多发伤的病人其免疫功能抑制的时间多在 1 周以上[8]。

淋巴细胞的活化增殖是发挥免疫应答的必要条件, 因而淋巴细胞增殖反应被认为是反映淋巴细胞功能的主要指标之一。由于 IL-2 的产生与 IL-2R 表达对 T 细胞活化并进入增殖状态至关重要, 休克后 IL-2 产生减少、IL-2 受体表达降低可能是淋巴细胞增殖受抑的主要原因。IL-2 产生及其受体表达降低的原因尚不清楚。有研究发现, 休克后 T 辅助细胞 (Th) 亚群发生改变, Th1 分泌 IL-2、INF-γ 减少, 而 Th2 分泌 IL-2、IL-10 增多, 增多的 IL-10 可直接抑制 T、B 细胞活性或通过抑制巨噬细胞抗原提呈能力及其协同因子 (如 IL-1) 分泌的间接途径抑制淋巴细胞功能[8]。

吞噬功能正常是巨噬细胞发挥非特异性免疫防御反应的重要保证。休克早期巨噬细胞吞噬功能受抑, 使机体的防御能力受到削弱, 这可能是造成创伤失血性休克后机体对感染易感性增加的重要原因之一。Kondo 等[9] 也发现休克复苏后早期 (24 h) 肝脏网状内皮吞噬系统对大肠杆菌的吞噬和杀灭能力均受到抑制。巨噬细胞吞噬清除能力下降除与血清调理素水平 (如纤维连结蛋白、C3b) 有关外, 与巨噬细胞本身的变化 (如其表面受体 Fc、C3b 表达减少) 也有关[9]。

巨噬细胞既作为吞噬细胞参与非特异性免疫反应, 又作为抗原提呈细胞参与特异性免疫反应。巨噬细胞将摄取的外来抗原加工后以 MHC- Ⅱ (Ia) 复合体形式表达于细胞表面, 被 T 细胞表面受体识别, 将抗原信号传递给 T 细胞, 从而启动特异性免疫反应。同时巨噬细胞还分泌适量的细胞因子 (如 IL-1、IL-6 等) 作为协同信号刺激 T 细胞活化。本实验发现休克后腹腔巨噬细胞抗原提呈能力下降, 细胞因子分泌减少, 这可能是淋巴细胞功能受抑制的原因之一, 也是休克后机体易于感染的另一重要原因[10]。

总之, 创伤合并失血性休克后机体免疫功能受到广泛影响, 淋巴细胞和巨噬细胞的功能受损, 并持续较长的时间。与以往的单纯创伤或失血性休克动物模型相比, 本实验结果更符合临床的实际情况, 因而更具有临床参考价值。本实验结果还为进一步研究创伤 - 失血性休克后免疫功能改变的发生机制, 探讨相应的免疫调理措施提供了重要线索。

参考文献

[1] B. 米舍尔 S. 施吉 [美] . 细胞免疫学方法选编 [M] . 北京: 人民卫生出版社, 1986. 20－22.

[2] Stephan R N, Kupper T S, Geha A S, *et al*. Hemorrhage with-

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

out tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis[J]. Arch Surg, 1987, 122(1):62—69.
[3] 陈永硕. 现代实用免疫细胞化学技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997. 98—101.
[4] Ayala A, Perrin M M, Chaudry I H. Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class Ⅱ(Ia) antigens[J]. Immunology, 1990, 70(1): 33—38.
[5] 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 152—154.
[6] Ayala A, Perrin M M, Wagner M A, *et al*. Enhanced susceptibility to sepsis following simple hemorrhage depression of Fc and C3b receptor-mediated phagocytosis[J]. Arch Surg, 1990, 125(1):70—75.
[7] Xu Y X, Ayala A, Chaudry I H. Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock[J]. J Trauma, 1998, 44(2): 335—341.
[8] Abaham E, Chang Y H. Hemorrhage-induced alterations in function and cytokine production of T cells and T cell subpopulations[J]. Clin Exp Immunol, 1992, 90(5):497—502.
[9] KondoS, Wang D, Mayumi T, *et al*. Effects of hemorrhagic shock and resuscitation upon hepatic phagocytic clearance and killing of circulating macroorganisms[J]. Shock, 1996, 5(2): 106—111.
[10] Stephan D S, Ayala A, Harkema J M, *et al*. Mechanism of immunosuppression following hemorrhage: defective antigen presentation by macrophages[J]. J Surg Res, 1989, 46(6): 553—556.

(编辑 王 红)

(上接 74 页)

血肿体积相差 20 ml 以上者为血肿扩大[1]。我们采用的血肿测量方法[2]: A×B×C/2。A: 出血范围的最大直径(cm), B: 垂直于 A 的最大直径, C: 血肿的张数乘片的厚度。本组 15 例均符合上述血肿扩大标准, 其中 1 例从 15 ml 增加到 80 ml(6 h), 还有 1 例从 30 ml 增加到 80 ml(96 h)。

2.2 持续性出血致血肿扩大的临床表现

2.2.1 意识障碍进行性加重意识障碍往往反映脑出血量的多少, 并能直接表现脑损害的程度, 被认为是判断预后的关键或首要因素。一般认为发病后意识障碍程度越重, 预后越差。有报道病后即意识障碍、缓慢出现意识障碍、始终意识清楚其死亡率分别为 88%、69%、15%[3]。当脑出血病人突然或逐渐意识障碍加深, 要考虑血肿是否增大。

2.2.2 血压持续性明显升高 发病时血压明显升高者预后差, Fujii[4] 报道病后血肿扩大随收缩压升高而增加。本组 1 例病人血压升高达 40/20 kPa, 多种脱水降压药无效。以上两种情况出现应及时复查头颅 CT, 以便明确血肿的大小。

2.3 血肿扩大的发生率、好发年龄与饮酒的关系及头颅 CT 特点

血肿扩大发生率各家报道不一, Fujii[1] 报道为 14.3% (60/419); Bal[5] 报道为 3% (10/320), 本组同期收治高血压性脑出血 173 例, 复查头颅 CT 血肿扩大 15 例, 发生率为 8.7%。国外报道血肿扩大的好发年龄 (59.3±11.9) 岁。本组平均年龄 58.4 岁, 与国外报道相似。血肿扩大时间于卒中后 5.5~109 h, 平均 40 h。Kazui[2] 报道血肿扩大于 6 h 内占 83%, 24~48 h 可能性很小。本组血肿扩大的时间为卒中后 6~120 h, 平均 87 h。本组还观察到饮酒者血肿易扩大, 本组饮酒 7 例, 与饮酒引起血压升高及肝功能、止血功能障碍有关[6]。从头颅 CT 的表现, 血肿扩大易发生在基底节和丘脑出血的病人。本组基底节出血 13 例, 占 86.7%。国外报道血肿的形态中以不规则形发生率高占 23.8%, 圆形占 10.6%。本组血肿不规则形 8 例, 圆形 7 例。

2.4 预后与防治

Bal 等[5] 报道高血压性脑出血时血肿急速扩大预后极差, 死亡率为 25%~100%。Fujii[1] 报道有无血肿扩大的死亡率分别为 38.1%、15.0%。本组死亡率 60%。血肿急速扩大, 致颅内压升高, 脑疝形成是死亡的主要原因。急诊手术治疗是预防血肿扩大的重要措施, 当首次 CT 扫描发现血肿形成不规则或体积较大者, 病情进行性加重伴肝功能障碍且长期饮酒 者应考虑尽早手术。国外文献报道手术最好在出血后 7 h 内进行, 因为出血后 7~8 h 可产生继发性脑水肿, 并提出显微下开颅手术, 直视下行电凝止血以不损伤血管干[5]。

总之, 通过临床观察总结出血肿扩大的特点与规律, 及时手术治疗, 可控制血肿的扩大, 减少并发症和降低死亡率。本组病例较少, 尚需进一步观察和总结。

关键词 高血压; 脑出血; 血肿扩大
中图法分类号 R544.106 文献标识码 B

参考文献

[1] Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, *et al*. Hemotoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1994, 80(1) 51—57.
[2] Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, *et al*. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage incidence and time course [J]. Stroke, 1996, 27(10):1783—1787.
[3] 赵忠新. 自发性脑出血急性期生命预后和影响因素[J]. 国外医学: 脑血管病学分册, 1996, 4(4): 227—229.
[4] Fujii Y. Hematoma enlargement in intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1994, 81(3):333—334.
[5] Bal H G, Seok K, Gyuyan I, *et al*. Rapid expansion of hypertensive intracerebral hemorrhage[J]. Neurosurgery, 1992, 31(1): 35—40.
[6] Juvela S, Hillbon M, Palomoka H, *et al*. Risk factors for spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 1995, 26(9): 1558—1564.

(编辑 张大春)

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