

• 论著 •

脓毒症患者血管内皮功能的细胞标记物检测

古秀雯 刘伟 毛恩强 汤耀卿 张圣道

【摘要】 目的 探讨脓毒症病程中循环内皮细胞(CEC)和内皮细胞微粒(EMP)数量的变化特点及其与炎症因子的关系。方法 选择脓毒症患者,按确诊当日急性生理学及慢性健康状况评分系统 I (APACHE I) 评分分为轻度(<9 分)、中度(9~15 分)和重度(>15 分)组,各组再按病情转归分为存活组及死亡组。于患者入院后 1、2、3、7、14 d 采血,共采集 127 份血标本,用流式细胞仪检测血中 CEC 和 EMP 数量,用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4 和 IL-10 的含量。结果 ①随着脓毒症病情的加重,EMP、TNF- α 及 IL-1 β 均显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。中度组 CEC 及 IL-10 均较轻度组增高,重度组 CEC 显著低于轻、中度组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。轻、中、重度组间 IL-4 及 IL-10 比较差异均无统计学意义。②死亡组及存活组 CEC 及 EMP 均随病情程度加重而升高;其中死亡组 EMP 及促炎因子均显著高于相同病情存活组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 CEC 及抗炎因子均显著低于相同病情存活组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 脓毒症患者随病情加重 CEC 及 EMP 水平明显增加,可作为反映病情严重程度的指标,且可用于判断预后。

【关键词】 脓毒症; 循环内皮细胞; 内皮细胞微粒

Studies on the cell markers of endothelial function in sepsis GU Xiu-wen, LIU Wei, MAO En-qiang, TANG Yao-qing, ZHANG Sheng-dao. Affiliated Ruijin Hospital Surgery Intensive Care Unit, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China
Corresponding author: LIU Wei, Email: bleulancet@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the phasic changes of the number of circulating endothelial cells (CEC) and endothelial microparticles (EMP) during the process of sepsis. **Methods** Thirty-one patients with sepsis were divided into mild group (<9), moderate group (9-15) and severe group (>15) according to the acute physiology and chronic health evaluation I (APACHE I) scores after onset, and each group was further divided into survivors and non-survivors. The level of CEC, EMP and pro-inflammatory cytokines were determined on 1, 2, 3, 7, 14 days after onset. **Results** ①The level of EMP, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the severe group were significantly higher than the mild group and moderate group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of CEC in the severe group was significantly lower than the mild group and moderate group ($P<0.05$ or $P<0.01$). ②The levels of CEC, EMP in the non-survivor and the survivor group were significantly higher with sepsis increased significantly; and the levels of EMP, pro-inflammatory in the non-survivor group were significantly higher than those of the survivor group ($P<0.05$ or $P<0.01$), but the levels of CEC, IL-4 and IL-10 in non-survivors were significantly lower than the survivors ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The levels of CEC and EMP in patients with sepsis increased significantly. They can not only serve as an index to reflect the severity of sepsis, but also have a prognostic value in patients with sepsis.

【Key words】 sepsis; circulating endothelial cell; endothelial microparticle

近年来,循环内皮细胞(CEC)和内皮细胞微粒(EMP)水平变化已成为慢性疾病中血管内皮细胞(VECs)功能障碍的指标之一,但在脓毒症中还没有此方面的研究。本研究中拟通过观察脓毒症患者血中 CEC 和 EMP 水平的变化,探讨其与疾病严重程度及炎症因子之间存在的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组:选择 2007 年 10 月—2008 年

5 月在本院外科重症监护病房(SICU)治疗的脓毒症患者 31 例,脓毒症诊断符合文献[1]标准,且排除糖尿病、心肌梗死、血栓性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、镰刀细胞性贫血等影响 CEC 和 EMP 的疾病史者。按脓毒症诊断明确当日急性生理学及慢性健康状况评分系统 I (APACHE I) 评分分为轻度(<9 分)、中度(9~15 分)和重度(>15 分)组。3 组间患者性别、年龄比较差异均无统计学意义;各组再按病情转归分为存活组及死亡组。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集:脓毒症患者于明确诊断 1、2、3、7、14 d 晨取深静脉导管血 3 ml(共 127 份)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.009

基金项目:上海市教委科研基金(06BZ035)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 ICU

通信作者:刘伟,Email:bleulancet@hotmail.com

1.2.2 细胞因子含量测定:离心分离血清, -80 ℃ 下保存。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4 和 IL-10。按照试剂盒说明书要求采用四参数方法绘制标准曲线, 用 CurveExpert 1.3 软件拟合标准曲线。

1.2.3 EMP 测定:将 1 ml 全血离心 2 min, 取 50 μ l 上清液, 加入 3 μ l PE-小鼠抗人 CD31 单克隆抗体(美国 BD 公司), 室温下避光孵育 60 min, 加 100 μ l 结合缓冲液以及 3 μ l 异硫氰酸荧光素/膜联蛋白(FITC/Annexin V, 美国 BD 公司)再孵育 15 min, 用流式细胞仪(美国 BD 公司)检测 EMP。

1.2.4 CEC 测定:①Ficoll 密度梯度离心: 3 ml 人淋巴细胞分离液(1.077 g/ml, 美国 SIGMA 公司)铺于离心管内, 1 \times 磷酸盐缓冲液(PBS)将抗凝血稀释 2 倍, 铺于分离液表面, 水平离心机离心 20 min。吸出界面处呈白色云雾状的单核细胞层, 1 \times PBS 清洗 2 次, 离心 10 min。②抗体标记: 100 μ l 1 \times PBS 重悬收获的目的细胞, 加入 FITC-小鼠抗人 CD45 单克隆抗体及 PE-小鼠抗人 CD146 单克隆抗体

(美国 BD 公司)各 2 μ l 室温下避光孵育 45 min; 加入 1 ml 人红细胞裂解液(美国 SIGMA 公司), 37 ℃ 水浴 5 min; 1 \times PBS 清洗, 离心 5 min, 重悬后加入 200 μ l 1% 甲醛水溶液固定。同型对照为 PE 标记和 FITC 标记的小鼠 IgG1(美国 BD 公司)。③CEC 检测: 以 CD146 阳性和 CD45 阴性作为 CEC 标记, 采用美国 BD 公司 FACalibur 流式细胞仪进行分析, 在前向角散射光和侧向角散射光双参数点图上对淋巴细胞群设窗, 收集细胞数共 5 \times 10⁵ 个, 数据计算结果以个/10⁵ 单核细胞表示。

1.3 统计学处理:计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SAS 13.0 统计软件分析, 采用 *t* 检验及方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CEC、EMP 和炎症细胞因子水平与脓毒症病情的关系(表 1):随着病情加重, EMP、TNF- α 及 IL-1 β 均显著增高(*P*<0.05 或 *P*<0.01); 中度组 CEC 及 IL-10 较轻度组增高; 但重度组 CEC 显著低于轻、中度组(*P*<0.05 或 *P*<0.01), 重度组 IL-4 及 IL-10 水平与轻、中度组比较差异无统计学意义。

表 1 不同病情程度脓毒症患者 CEC、EMP 及细胞因子水平的动态变化($\bar{x}\pm s$)^a

组别	CEC(个/10 ⁵ 单核细胞)					EMP(个/ml)				
	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d
轻度组	24.60 \pm 7.90(7)	28.15 \pm 6.98(6)	32.65 \pm 10.37(5)	25.91 \pm 3.81(7)	17.15 \pm 4.77(2)	204.41 \pm 62.14(7)	130.44 \pm 45.67(6)	54.63 \pm 23.77(5)	86.03 \pm 41.95(7)	34.36 \pm 12.50(2)
中度组	25.65 \pm 6.49(14)	34.31 \pm 8.17(13)	39.47 \pm 8.35(13)	27.88 \pm 5.94(10)	18.74 \pm 5.53(6)	222.38 \pm 57.44(14)	160.60 \pm 39.20(13)	112.07 \pm 40.16(13) ^b	122.90 \pm 37.11(10) ^a	80.87 \pm 29.14(6) ^b
重度组	14.52 \pm 7.56(11) ^{bd}	14.21 \pm 6.81(11) ^{bd}	12.23 \pm 3.81(9) ^{bd}	12.22 \pm 4.61(7) ^{bd}	11.54 \pm 4.78(6) ^{ac}	249.04 \pm 73.51(11)	192.57 \pm 56.66(11) ^a	158.88 \pm 35.72(9) ^{bc}	144.99 \pm 51.91(7) ^a	140.13 \pm 48.96(6) ^{bd}
组别	TNF- α (ng/L)					IL-1 β (ng/L)				
	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d
轻度组	37.97 \pm 6.61(7)	38.92 \pm 10.92(6)	25.15 \pm 10.68(5)	53.26 \pm 16.92(7)	32.35 \pm 12.91(2)	17.20 \pm 6.40(7)	15.61 \pm 8.34(6)	27.22 \pm 8.78(5)	17.53 \pm 8.65(7)	15.20 \pm 5.57(2)
中度组	75.17 \pm 15.85(14) ^b	64.07 \pm 14.28(13) ^b	51.58 \pm 16.08(13) ^b	64.32 \pm 9.97(10)	51.43 \pm 29.81(6)	20.65 \pm 10.14(14)	29.05 \pm 8.87(13) ^a	30.71 \pm 11.97(13)	29.88 \pm 10.89(10) ^a	23.79 \pm 9.64(6) ^a
重度组	94.20 \pm 18.54(11) ^{bc}	81.44 \pm 15.92(11) ^{bc}	111.35 \pm 21.96(9) ^{bd}	84.84 \pm 17.20(7) ^{bc}	75.51 \pm 11.24(6) ^{bc}	31.56 \pm 12.99(11) ^a	40.28 \pm 11.73(11) ^{bc}	38.51 \pm 9.30(9) ^a	36.31 \pm 9.70(7) ^a	29.74 \pm 6.09(6) ^b
组别	IL-4 (ng/L)					IL-10 (ng/L)				
	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d
轻度组	26.28 \pm 11.78(7)	25.47 \pm 9.04(6)	21.36 \pm 2.91(5)	30.12 \pm 11.97(7)	34.22 \pm 10.03(2)	33.25 \pm 9.56(7)	49.57 \pm 12.99(6)	25.49 \pm 8.70(5)	39.63 \pm 9.11(7)	30.76 \pm 11.03(2)
中度组	27.52 \pm 8.70(14)	33.77 \pm 15.87(13)	30.88 \pm 8.92(13) ^a	49.82 \pm 14.31(10) ^a	41.66 \pm 11.71(6)	28.78 \pm 7.56(14)	39.78 \pm 8.08(13) ^b	46.41 \pm 11.87(13) ^b	41.39 \pm 14.40(10)	30.34 \pm 11.11(6)
重度组	26.17 \pm 14.98(11)	32.35 \pm 17.98(11)	30.23 \pm 18.79(9)	49.34 \pm 20.21(7)	33.84 \pm 9.09(6)	26.70 \pm 14.11(11)	44.50 \pm 13.92(11)	45.41 \pm 10.40(9) ^b	40.27 \pm 17.84(7)	30.63 \pm 14.79(6)

注: 与轻度组比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01; 与中度组比较, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.05; 括号内为样本数

表 2 脓毒症患者 CEC 和 EMP 与病情转归的关系($\bar{x} \pm s$)

组别	预后	样本数	CEC(个/10 ⁶ 单核细胞)	EMP(个/ml)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-4(ng/L)	IL-10(ng/L)
轻度组	存活	27	26.40 \pm 6.41	116.60 \pm 38.92	38.82 \pm 11.96	18.64 \pm 11.80	26.77 \pm 12.44	37.33 \pm 9.01
中度组	死亡	9	22.86 \pm 5.27	181.74 \pm 62.03 ^a	66.70 \pm 15.10 ^b	29.14 \pm 11.45	28.76 \pm 3.47	28.53 \pm 5.38
	存活	47	29.24 \pm 10.04 ^c	144.34 \pm 48.44 ^c	40.19 \pm 8.35 ^d	20.45 \pm 8.27 ^e	37.06 \pm 16.83 ^c	38.63 \pm 7.16 ^c
重度组	死亡	17	24.71 \pm 5.98	190.01 \pm 60.36 ^b	103.21 \pm 23.47 ^{bd}	36.55 \pm 11.10 ^a	32.31 \pm 13.69	43.71 \pm 12.74
	存活	27	36.21 \pm 7.16 ^{bf}	165.33 \pm 36.21 ^{ac}	53.93 \pm 17.81 ^f	23.70 \pm 9.46 ^c	46.72 \pm 15.89 ^{bc}	56.05 \pm 10.67 ^{bde}

注:与轻度组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与中度相同预后组比较,^c $P < 0.01$;与本组死亡比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

2.2 CEC 和 EMP 与脓症患者病情转归的关系(表 2):死亡组及存活组 CEC 及 EMP 均随病情程度加重而升高;死亡组 EMP 及促炎因子水平均显著高于相同病情存活组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 CEC 及抗炎因子水平均显著低于相同病情存活组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

VECs 是衬覆于血管内壁的单层扁平细胞,其不仅是循环血液与血管平滑肌间的机械屏障,还是体内最大的内分泌器官,在调节血管功能和内环境稳定方面起重要作用。脓毒症时,由于大量内毒素和炎症介质的刺激可引起 VECs 凋亡,后者导致的毛细血管渗漏可加重器官功能障碍^[2]。因此,VECs 功能障碍可认为是脓毒症发展恶化的中心环节。

监测 VECs 功能的指标有可溶性介质和循环细胞,前者包括血清血管性假血友病因子(vWF)、可溶性血栓调节素、可溶性黏附分子(E-选择素、细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1),后者包括 CEC、内皮祖细胞(EPC)和 EMP。相比而言,作为评估内皮细胞功能的指标,血栓调节素和黏附分子容易受到其他细胞(血小板、中性粒细胞也表达这些蛋白质)的影响,而 vWF 和循环细胞则较为可靠。CEC 是循环血中的 VECs,正常情况下,一定数量的 CEC 是 VECs 新陈代谢的结果。病理情况时,CEC 的数量可发生明显的变化,能直接而特异性地反映机体 CEC 的损伤情况,且主要反映内皮细胞的脱落性损伤^[3]。乔万海等^[4]研究发现,多器官功能障碍综合征患者 VECs 功能受损,外周血中 CEC 的数量明显增多,本研究中有同样的结果。

EMP 是由活化或凋亡的内皮细胞释放的小囊泡,其表面含有大量的磷脂酰丝氨酸,同时表达内皮细胞的表面抗原,其中凋亡内皮细胞产生表达结构性标志(CD31 和 CD105)的 EMP 增加,而表达可诱导标志(CD54 和 CD62E)的 EMP 增加则在活化内皮细胞产生^[5]。目前 CEC 和 EMP 在血液系统疾病和糖尿病等多种疾病中都有增加的报道,但有关脓

毒症中的研究报道却很少,人们已逐渐开始关注危重病领域中内皮细胞的研究。

脓毒症中最主要的炎症介质是 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 及 IL-10 等^[6]。TNF- α 是炎症反应的启动因子,可刺激单核/巨噬细胞产生 IL-1,并呈剂量依赖性。脓毒症过程中,TNF- α 和干扰素可诱导整联蛋白 $\alpha\beta$ 导致内皮细胞脱落^[7];内皮细胞合成分泌的白细胞趋化因子及表达的黏附分子增加,促进白细胞与内皮细胞黏附,而中性粒细胞可通过释放蛋白酶来降解粘连蛋白促进内皮细胞脱落^[8]。以上可解释本试验中轻、中度组 CEC 随着促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 的增加而增加,但重度组 CEC 数量显著低于轻、中度组,考虑与以下几方面有关:①TNF 及 IL-1 在激活内皮细胞表达多种炎症因子同时还能诱导细胞凋亡^[9],而 IL-4 及 IL-10 是体内主要的抗炎细胞因子,能下调促炎细胞因子的分泌。但本组结果显示,重度组抗炎因子并未随病情加重而增加,细胞因子平衡被打乱,这使得重度组内皮细胞凋亡率较轻、中度组增加。同时本试验方法检测的 CEC 不包括凋亡的内皮细胞。②本试验方法检测的 EMP 由凋亡的内皮细胞产生,随着病情加重,EMP 数量增加,与促炎因子变化的趋势相同;而 EMP 能促进炎症反应,并使内皮细胞凋亡率进一步增加^[10-11],这是一个正反馈过程。

根据患者转归分组显示,各指标随病情加重逐渐增加,死亡组 CEC、IL-4 及 IL-10 均较存活组显著降低,而 EMP、TNF- α 及 IL-1 β 则均显著高于存活组,表明死亡组炎症细胞因子水平紊乱,内皮细胞凋亡率增加。因此,检测脓症患者 CEC 及 EMP 有助于判断患者预后情况。

参考文献

- [1] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med, 2003, 31(4):1250-1256.
- [2] Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. Crit Rev Immunol, 2003, 23(4):267-299.
- [3] Hunting CB, Noort WA, Zwavinga JJ. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium; vascular

injury, repair and neovascularization. *Vox Sang*, 2005, 88(1): 1-9.

[4] 乔万海,王静,裴红红,等.多器官功能障碍综合征患者循环内皮细胞数量和血脂水平变化及临床意义. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(3):165-167.

[5] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res*, 2003, 109(4):175-180.

[6] 李春盛.关于多脏器功能障碍综合征的几个问题. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(6):326-327.

[7] Boehme MW, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology*, 2002, 107(3): 340-349.

[8] Ruegg C, Dormond O, Foletti A. Suppression of tumor angio-

genesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells; which side to target? *Endothelium*, 2002, 9(3):151-160.

[9] Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(6):L899-914.

[10] Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, et al. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem*, 1992, 267(21):15168-15175.

[11] Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro; role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3):H1106-1114.

(收稿日期:2008-11-16 修回日期:2008-12-29)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

绵竹地区“5·12”汶川特大地震伤员的早期流行病学分析

金鸿 魏平波

【关键词】地震；四川汶川；流行病学

绵竹地区是“5·12”四川汶川特大地震中极重灾区之一。作为绵竹地区的医疗救治中心,本院在地震后的24h内收治了大量伤员,现采用随机抽样对其中的1376例患者进行分析,报告如下。

1 临床资料

1.1 资料来源:地震发生后数小时内,大量伤员涌入医院,医院将医护人员按1:2~3配对进行分区救治,并对其中1376例地震伤员(年龄3~87岁,平均36.9岁,男:女1.1:1)进行了随机调查统计,统计误差率<5%。将救治小组收集的原始数据用SPSS统计软件进行处理。

1.2 早期救治方法及转归:由于灾后的紧急情况,对伤员的救治方法主要为:骨折的手法复位,固定;开放性骨折伤口的包扎;皮肤裂口清创缝合,失血患者建立静脉通道进行扩容、补液;危重患者尽力组织抢救,必要时转院。1376例患者中24h内转院271例。其余继续治疗,至5月13日14:30未转院患者中死亡98例。

1.3 分析方法:各类单病种伤员均不包括合并伤,合并伤伤员包括所有的不同

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.010
作者单位:618200 四川绵竹,绵竹市人民医院

表1 1376例地震伤患者伤情分类

创伤类型	例数	构成比(%)	转院例数	死亡例数	住院病死率(%)
重型颅脑损伤	129	9.37	65	32	48.5
腹部闭合伤	86	6.25	57	27	31.3
胸腔损伤并血气胸	5	0.36	2	3	100.0
四肢骨折	923	67.08	92	23	2.5
脊柱、骨盆骨折	208	15.12	34	9	4.3
合并伤	25	1.82	21	4	100.0
合计	1376		271	98	

部位的合并伤,转院者未统计其病死率,24h后死亡者未计算在内。

1.4 结果:表1显示,地震伤早期创伤类型为四肢骨折>脊柱、骨盆骨折>重型颅脑损伤>腹部闭合伤。地震伤早期虽经本院初步救治,但病死率仍然较高,排序为重型颅脑损伤>腹部闭合伤>脊柱、骨盆骨折>四肢骨折。其中胸腔损伤病例较少,抽样误差大($P>0.05$),故未统计在内;有合并伤者病死率明显高于无合并伤者($P<0.01$)。

在1376例患者中,经过临床经验初步判断需要急诊手术者499例,占36.3%,其中转院253例,剩下246例未转院者中除12例放弃治疗回家外,其余均在2~3d内死亡,故应该急诊手术而无条件手术的患者病死率高达46.9%。

2 讨论

总结本次地震伤的特点不难看出,受伤最多的为四肢骨折和脊柱、骨盆骨折,而早期病死率最高的是重型颅脑损

伤和腹部闭合性损伤。根据临床经验判断需手术治疗而未得到及时有效的手术治疗是造成地震伤后极早期患者死亡的主要原因。灾后大批患者涌入灾区一线医院,加上医院本身受损,导致手术、输血等急救措施丧失;灾区周边医院医疗资源严重短缺,伤员不能无条件及时转院获得有效救治,使之丧失了宝贵的抢救时机。因此在地震后早期搭建有针对性的急诊手术治疗平台是有效降低伤员早期病死率的保障。秦银河^[1]早在2003年就提出了关于建立我国灾难医疗系统的设想,这是在灾难后短时间内能迅速为灾区建立手术平台,有效降低病死率和伤残率的重要保障。

参考文献

[1] 秦银河.关于建立我国灾难医疗系统的设想. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(5):259-261.

(收稿日期:2008-11-11)

(本文编辑:李银平)