

## • 论著 •

## 严重烧伤患者外周血树突细胞的变化及临床意义

刘茜 陆江阳 王晓虹 张政

**【摘要】** 目的 探讨严重烧伤患者外周血树突细胞(DC)的变化及与烧伤严重程度和脓毒症发生的关系。方法 22例严重烧伤患者根据脓毒症的诊断分为烧伤组(10例)和烧伤脓毒症组(12例),按烧伤总体表面积(TBSA)分为TBSA I组(TBSA 30%~50%,14例)和TBSA II组(TBSA 51%~80%,8例)。采集患者伤后1、3、7、14和20 d外周静脉血,用流式细胞仪检测外周血中髓样树突细胞(mDC, Lineage1<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>)和浆样树突细胞(pDC, Lineage1<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>)两种DC亚型的数量。以同期10例健康体检者作为对照。结果 健康对照组外周血mDC为(0.450±0.150)%,pDC为(0.241±0.084)%。与健康对照组比较,烧伤组患者伤后1、3、7 d外周血mDC[(0.257±0.116)%、(0.274±0.086)%、(0.317±0.056)%]和pDC[(0.122±0.058)%、(0.165±0.051)%、(0.177±0.024)%]均显著减少(均 $P<0.05$ ),14 d、20 d时mDC、pDC数量恢复至正常水平;烧伤脓毒症组患者伤后1 d外周血mDC[(0.230±0.090)%]和pDC[(0.114±0.071)%]即较烧伤组进一步减少(均 $P<0.05$ ),至20 d时外周血mDC和pDC仍显著低于烧伤组[mDC:(0.246±0.076)%比(0.412±0.097)%;pDC:(0.097±0.032)%比(0.203±0.039)%],均 $P<0.05$ 。与健康对照组比较,TBSA I组患者伤后1、3、7 d外周血mDC[(0.266±0.062)%、(0.289±0.071)%、(0.351±0.054)%]和pDC[(0.131±0.025)%、(0.163±0.037)%、(0.178±0.038)%]均显著减少(均 $P<0.05$ ),14 d、20 d时mDC、pDC数量恢复至正常水平;TBSA II组患者伤后1 d外周血mDC[(0.227±0.070)%]和pDC[(0.112±0.047)%]即较TBSA I组进一步减少(均 $P<0.05$ ),至20 d外周血mDC和pDC仍显著低于TBSA I组[mDC:(0.297±0.072)%比(0.423±0.046)%;pDC:(0.107±0.061)%比(0.197±0.042)%],均 $P<0.05$ 。结论 严重烧伤患者早期外周血mDC和pDC数量均减少,烧伤程度越严重DC数量减少越明显;外周血DC数量减少导致烧伤后机体免疫功能低下,数量减少明显者易并发脓毒症;烧伤后定期检测外周血DC数量可以作为脓毒症的早期预警指标。

**【关键词】** 烧伤; 外周血; 髓样树突细胞; 浆样树突细胞; 脓毒症

**Changes in peripheral dendritic cells in serious burn patients and its clinical significance** LIU Qian\*, LU Jiang-yang, WANG Xiao-hong, ZHANG Zheng. \* Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: LU Jiang-yang, Email: luji@263.net

**【Abstract】** **Objective** To explore the changes in peripheral dendritic cells (DCs) in serious burn patients and its relationship with the burn severity and pathogenesis of sepsis. **Methods** Twenty-two serious burn patients were divided into the burn group ( $n=10$ ) and the burn sepsis group ( $n=12$ ) according to diagnostic criteria of sepsis, they were stratified according to the total burn surface area (TBSA), into the TBSA I group (TBSA 30%–50%,  $n=14$ ) and the TBSA II group (TBSA 51%–80%,  $n=8$ ). Peripheral blood of all patients was collected on 1, 3, 7, 14, 20 day after burn. The number of two subtypes of peripheral DC i. e. myeloid dendritic cells (mDC, Lineage1<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) and plasmacytoid dendritic cells (pDC, Lineage1<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>) were quantified by flow cytometer. Ten healthy volunteers served as normal controls at the same time. **Results** In the healthy control group, mDC in the peripheral blood was (0.450±0.150)% and pDC was (0.241±0.084)%. Compared with the healthy control group, in the burn group both mDC [(0.257±0.116)%, (0.274±0.086)%, (0.317±0.056)%] and pDC [(0.122±0.058)%, (0.165±0.051)%, (0.177±0.024)%] decreased significantly on 1, 3, 7 day after burn (all  $P<0.05$ ), and the number returned to the normal level on 14 day and 20 day. Compared with the burn group, the number of mDC [(0.230±0.090)%] and pDC [(0.114±0.071)%] in patients of the burn sepsis group were significantly lower (both  $P<0.05$ ) on 1 day after burn. Both cells [mDC (0.246±0.076)% vs. (0.412±0.097)% and pDC (0.097±0.032)% vs. (0.203±0.039)%] were still significantly lower (both  $P<0.05$ ) on 20 day. Both mDC [(0.266±0.062)%, (0.289±0.071)%, (0.351±0.054)%] and pDC [(0.131±0.025)%, (0.163±0.037)%, (0.178±0.038)%] in the patients in the TBSA I group decreased significantly on 1, 3, 7 day after burn as compared with those of the healthy control group (all  $P<0.05$ ), and they returned to the normal level on 14 day and 20 day. Compared with the TBSA I group, mDC [(0.227±0.070)%] and pDC [(0.112±0.047)%] in patients of the TBSA II group decreased significantly (both  $P<0.05$ ) on 1 day after burn, and both cells [mDC (0.297±0.072)% vs. (0.423±0.046)% and pDC (0.107±0.061)% vs. (0.197±0.042)%] were still significantly lower (both  $P<0.05$ ) on 20 day. **Conclusion** Both the number of mDC and pDC decrease in peripheral blood in early stage in

serious burn patients, and those who have more serious burn have lower number of mDC or pDC. Deficiency in mDCs and pDC subsets may contribute to immunosuppression in burn victims, and those who suffered obvious loss of mDC and pDC are susceptible to sepsis following severe burn. It indicates that the percentage of mDC and pDC can be a predictive index of sepsis after burn.

【Key words】 Burn; Peripheral; Myeloid dendritic cell; Plasmacytoid dendritic cell; Sepsis

严重烧伤后机体免疫功能低下,易发生感染,甚至脓毒症。对烧伤后机体免疫功能变化的研究主要集中在巨噬细胞和淋巴细胞,但对外周血树突细胞(DC)的变化研究很少<sup>[1]</sup>。以往研究显示,在严重创伤、脓毒症病程中,机体免疫器官和外周血 DC 数量及功能均发生变化,且与病程进展密切相关<sup>[2-4]</sup>。本研究中通过检测严重烧伤患者及烧伤并发脓毒症患者外周血 DC 数量的变化,探讨外周血 DC 数量是否可作为烧伤患者并发脓毒症的早期预警指标。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象选择及分组:2006 年 11 月至 2008 年 5 月本院住院烧伤总体表面积(TBSA)30%~80%的严重烧伤患者 22 例;其中男 16 例,女 6 例;年龄 24~55 岁,平均(40.5±7.6)岁。排除伴有免疫功能抑制、长期大量服用激素的患者及肿瘤患者。烧伤患者接受抗休克及抗菌药物治疗;入院 1、3、7、14 及 20 d 抽取静脉血肝素抗凝备用。根据脓毒症诊断标准<sup>[5]</sup>将患者分为烧伤组(10 例)和烧伤脓毒症组(12 例)。根据 TBSA 不同将患者分为两组:TBSA 30%~50%为 I 组(14 例),TBSA 51%~80%为 II 组(8 例)。另选择同期健康体检者 10 例作为健康对照组,其中男 5 例,女 5 例;年龄 21~45 岁,平均(36.0±6.8)岁。各组性别、年龄比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ ),有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,并获得患者或家属知情同意。

## 1.2 检测指标与方法

1.2.1 主要试剂与仪器:人外周血 DC 检测试剂盒(美国 BD Bioscience 公司),包括藻素蛋白标记的人白细胞 DR 抗原单克隆抗体(单抗)、藻红蛋白标记的 CD11c 单抗、藻红蛋白标记的 CD123 单抗、异硫氰酸荧光素标记的 Lineage1 单抗。流式细胞分析仪(美国 BD FACSCalibur 公司)。

1.2.2 外周血髓样树突细胞(mDC)、浆样树突细胞(pDC)数量检测:取抗凝血 200  $\mu$ l,测定管和对照

管分别加入抗人血 DC 抗原混合物 10  $\mu$ l 和对照混合物 10  $\mu$ l,与荧光标记抗体 10  $\mu$ l 一同室温避光孵育 20 min,加红细胞裂解液室温避光放置 10 min,离心后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,加 400  $\mu$ l PBS 混匀后上机检测,用 CellQuest 软件分析,以各 DC 亚型占外周血单个核细胞的百分比表示。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组样本均数间比较方差齐者采用  $t$  检验,方差不齐者采用  $t'$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 外周血 DC 亚群与烧伤并发脓毒症的关系(表 1):与健康对照组比较,烧伤组伤后 1 d 起外周血 mDC 与 pDC 数量均显著降低(均  $P<0.05$ ),14 d、20 d 时恢复至正常水平(均  $P>0.05$ )。烧伤脓毒症组外周血 mDC 与 pDC 数量较烧伤组进一步降低,伤后各时间点均显著低于健康对照组和烧伤组(均  $P<0.05$ )。

表 1 是否伴发脓毒症的烧伤患者伤后不同时间点外周血 mDC、pDC 数量变化比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	伤后时间	例数	mDC(%)	pDC(%)
健康对照组		10	0.450±0.150	0.241±0.084
烧伤组	1 d	10	0.257±0.116 <sup>a</sup>	0.122±0.058 <sup>a</sup>
	3 d	10	0.274±0.086 <sup>a</sup>	0.165±0.051 <sup>a</sup>
	7 d	10	0.317±0.056 <sup>a</sup>	0.177±0.024 <sup>a</sup>
	14 d	10	0.365±0.054	0.187±0.037
	20 d	10	0.412±0.097	0.203±0.039
烧伤脓毒症组	1 d	12	0.230±0.090 <sup>ab</sup>	0.114±0.071 <sup>ab</sup>
	3 d	12	0.245±0.051 <sup>ab</sup>	0.148±0.063 <sup>ab</sup>
	7 d	12	0.242±0.089 <sup>ab</sup>	0.167±0.037 <sup>ab</sup>
	14 d	12	0.258±0.087 <sup>ab</sup>	0.115±0.042 <sup>ab</sup>
	20 d	12	0.246±0.076 <sup>ab</sup>	0.097±0.032 <sup>ab</sup>

注:mDC,髓样树突细胞;pDC,浆样树突细胞;与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,与烧伤组同期比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

2.2 外周血 DC 亚群与烧伤严重程度的关系(表 2):TBSA I 组患者中 5 例发生脓毒症,发生率 35.7%;TBSA II 组患者中 7 例发生脓毒症,发生率 87.5%。TBSA I 组患者伤后 1、3、7 d 外周血 mDC、pDC 数量均较健康对照组显著降低(均  $P<0.05$ ),14 d、20 d 时外周血 mDC、pDC 数量恢复至正常水

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.11.011

基金项目,全军“十一五”医学科研基金项目(06MB307)

作者单位,100048 北京,解放军总医院第一附属医院病理科(刘茜、陆江阳、王晓虹),解放军第三〇二医院全军肝病研究所(张政)

通信作者,陆江阳,Email,lujy@263.net

平(均  $P > 0.05$ )。TBSA I 组患者伤后各时间点外周血 mDC、pDC 数量显著低于健康对照组和 TBSA I 组(均  $P < 0.05$ )。

表 2 不同烧伤面积患者伤后不同时间点外周血 mDC、pDC 数量变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	伤后时间	例数	mDC(%)	pDC(%)
健康对照组		10	0.450±0.150	0.241±0.084
TBSA I 组	1 d	14	0.266±0.062 <sup>a</sup>	0.131±0.025 <sup>a</sup>
	3 d	14	0.289±0.071 <sup>a</sup>	0.163±0.037 <sup>a</sup>
	7 d	14	0.351±0.054 <sup>a</sup>	0.178±0.038 <sup>a</sup>
	14 d	14	0.392±0.033	0.182±0.054
	20 d	14	0.423±0.046	0.197±0.042
TBSA II 组	1 d	8	0.227±0.070 <sup>ab</sup>	0.112±0.047 <sup>ab</sup>
	3 d	8	0.225±0.093 <sup>ab</sup>	0.141±0.066 <sup>ab</sup>
	7 d	8	0.253±0.081 <sup>ab</sup>	0.160±0.052 <sup>ab</sup>
	14 d	8	0.264±0.067 <sup>ab</sup>	0.106±0.049 <sup>ab</sup>
	20 d	8	0.297±0.072 <sup>ab</sup>	0.107±0.061 <sup>ab</sup>

注:mDC,髓样树突细胞;pDC,浆样树突细胞;TBSA I 组,烧伤总体表面积 30%~50%,TBSA II 组,烧伤总体表面积 51%~80%,与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TBSA I 组同期比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

以往的研究发现,烧伤后免疫功能紊乱促进了脓毒症的发展,DC 作为重要的免疫调节细胞在脓毒症免疫功能紊乱中起重要的作用<sup>[2,6-9]</sup>。DC 是机体最重要的抗原呈递细胞,可将抗原信息呈递给 T 细胞,启动特异性免疫应答;mDC 和 pDC 来源于相同的骨髓前体细胞,但在免疫表型及功能方面有区别;mDC 表达 CD11c 而不表达 CD123,mDC 被激活后产生大量白细胞介素-12(IL-12)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),介导辅助性 T 细胞 0(Th0)向 Th1 型细胞分化;pDC 高表达 CD123 而不表达 CD11c,受抗原刺激后产生大量的  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),作用于 Th0,使之向 Th2 型细胞分化<sup>[10-11]</sup>。

在本课题组以往对多器官功能障碍综合征(MODS)脾脏 DC 作用的研究基础上<sup>[2]</sup>,本研究中观察了大面积烧伤患者及烧伤脓毒症患者外周血 DC 数量的动态变化,所用检测试剂盒为组合型单抗 CD3、CD8、CD19、CD14 和 CD56,排除了 T 细胞、B 细胞、单核细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)的影响,分析 Lineage1<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> DC 的结果可靠。结果显示,严重烧伤后 1 d 外周血 DC 数量(即 mDC 与 pDC 亚群)即显著降低,烧伤脓毒症组降低更显著;烧伤组 DC 数量呈现一过性降低后至 14 d 恢复至正常水平,而烧伤脓毒症组 DC 数量持续降低,至 20 d 仍低于健康对照组和烧伤组。烧伤后外周血

DC 的这种变化规律与本课题组前期发现 MODS 患者脾脏 DC 数量显著降低的变化<sup>[2]</sup>基本一致。说明烧伤能够导致外周血 DC 数量降低,烧伤脓毒症患者降低的程度更为显著,且持续降低。

临床上表现为烧伤后脓毒症的发生与烧伤面积呈正相关,因此本研究中又根据烧伤面积将患者分为 TBSA 30%~50%组和 TBSA 51%~80%组。结果发现,烧伤面积与 DC 数量减少呈正相关。表明烧伤面积越大,外周血 DC 数量降低越显著,患者发生脓毒症的概率增加。本研究结果显示 mDC 与 pDC 的变化程度基本相似,说明烧伤及脓毒症可使外周血 mDC 和 pDC 两种亚群都发生减少。

综上所述,烧伤导致外周血 DC 数量减少,烧伤并发脓毒症患者早期 DC 数量减少显著且呈持续降低;烧伤面积越大,外周血 DC 数量减少越明显,发生脓毒症的概率增加。因此,动态检测外周血 mDC 与 pDC 的数量,可以作为预测烧伤脓毒症发生的早期预警指标。

### 参考文献

- [1] Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis, an update. Crit Care Med, 2001, 29, S109-116.
- [2] 陆江阳,李志宏,王晓虹,等. 脾脏树突状细胞在多器官功能障碍综合征中的变化及意义. 中国危重病急救医学, 2006, 18, 24-27.
- [3] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. J Immunol, 2002, 168, 2493-2500.
- [4] Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, et al. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294, C754-764.
- [5] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学. 北京, 科学技术文献出版社, 2008, 6-7.
- [6] Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. J Pathol, 2008, 214, 211-223.
- [7] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 2002, 420, 885-891.
- [8] Guisset O, Dilhuydy MS, Thiébaud R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. Intensive Care Med, 2007, 33, 148-152.
- [9] Takahashi K, Satoi S, Yanagimoto H, et al. Circulating dendritic cells and development of septic complications after pancreatectomy for pancreatic cancer. Arch Surg, 2007, 142, 1151-1157.
- [10] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol, 2002, 2, 151-161.
- [11] Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. Curr Opin Immunol, 1999, 11, 392-399.

(收稿日期, 2011-03-11)

(本文编辑, 李银平)