

脓毒症患者血清相关细胞因子检测及意义*

杨倩¹ 刘黎¹ 马娣¹ 朱长清¹ 陆晓晔¹

[摘要] 目的:探讨脓毒症患者血清中与 T 细胞相关的细胞因子、趋化因子等的水平,评价脓毒症患者的免疫情况以及与脓毒症的关系。**方法:**收集 2012-01—2017-06 期间入住我院急诊科 112 例脓毒症患者以及同期体检中心 40 例健康体检患者,通过 Luminex Bio-plex 悬液芯片系统检测多细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、MCP-1、MIP-1 β 、TNF- α 浓度,对两组患者整体验证后进行比较分析。**结果:**①两组患者的临床特征比较显示性别构成、年龄、总胆红素均差异无统计学意义,白细胞计数、肌酐、谷丙转氨酶、CRP、PCT、低密度脂蛋白显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、白蛋白在脓毒症组要显著低于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);②细胞因子 IL-1 β 、IL-5、IL-17 浓度在两组间均差异无统计学意义,而脓毒症组趋化因子 MCP-1、MIP-1 β 、IL-8 和集落刺激因子 G-CSF、GM-CSF、TNF- α 以及细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-7、IL-2、IL-10、IL-12、IL-13 浓度显著高于正常对照组($P < 0.05$)。**结论:**脓毒症患者 IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-12、IL-13、MCP-1、MIP-1 β 、TNF- α 浓度显著高于正常对照组,这些细胞因子可能对脓毒症的早期诊断有指导意义。

[关键词] 脓毒症;细胞因子;早期诊断

doi: 10.13201/j.issn.1009-5918.2017.12.006

[中图分类号] R631 **[文献标志码]** A

Cytokines of serum related detection and significance in septic patients

YANG Qian LIU Li MA Di ZHU Changqing LU Xiaoye

(Department of Emergency, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200127, China)

Corresponding author: LIU Li, E-mail: lily_1231@126.com

Abstract Objective: To evaluate immune conditions and its relationships with sepsis in septic patients by exploring the serum levels of cytokines and chemokines associated with T-cell in these patients. **Method:** A total of 112 septic patients admitted to the emergency department in our hospital from January 2012 to June 2017 were enrolled in septic group. Another 40 healthy people were chosen as controls at the same time. Cytokine concentrations in serum, including IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1, MIP-1 β and TNF- α , were assessed with Luminex Bio-plex system in both of groups. **Result:** ① No difference in gender, age and serum level of total bilirubin was observed between septic group and control group ($P > 0.05$). Whereas, serum levels of white blood cell count, creatinine, cereal third transaminase, CRP, PCT, and low-density lipoprotein, were significantly higher in septic group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while serum levels of triglyceride, cholesterol, high-density lipoprotein and albumin in septic group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ② The serum cytokines including IL-1 β , IL-5 and IL-17 in the two groups did not differ, however, the chemokines including MCP-1, MIP-1 β and IL-8, colony stimulating factors including G-CSF, GM-CSF and TNF- α , and cytokines including IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-7, IL-2, IL-10, IL-12, IL-13 in septic group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The serum cytokines which include IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α in septic patients were significantly higher than those of control group. As a result, the cytokines mentioned above may have guiding significance when it comes to early diagnosis of sepsis.

Key words sepsis; cytokines; early diagnosis

当机体受到严重创伤或刺激后,可使促炎因子释放呈失控状态,致使机体保持高度的代谢状态,最终导致机体出现全身性炎症反应(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。随着炎症递质不断增多,逐渐出现内源性抗炎递质,而抗

炎递质过量时会引发机体免疫功能大幅降低。

脓毒症(sepsis)是指宿主对感染的反应失调而致的危及生命的器官功能障碍,也就是说当机体对感染的反应损伤了自身的组织和器官进而危及生命就称为脓毒症^[1]。脓毒症以及脓毒症休克是危重症领域的重大难题,每年至少有 1/4 的患者丧命于此。与多发伤、急性心肌梗死以及卒中相似,在初始几个小时,早期识别以及合理的处理是可以改

* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研计划项目(No:201540245)

¹ 上海交通大学医学院附属仁济医院急诊科(上海,200127)
通信作者:刘黎, E-mail: lily_1231@126.com

善预后的。脓毒症的发生是多种内源性细胞因子共同对神经免疫和代谢系统作用的结果,体内炎症细胞因子浓度过高,则可能出现严重的免疫抑制,感染进一步加重,因而促炎症细胞因子的浓度高低可作为衡量患者感染和 SIRS 严重程度的指标。已有研究表明脓毒症过程有重要影响的促炎症细胞因子主要有 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 等,此外还有下调炎症反应的抗炎症细胞因子如 S-TNF-R 和 IL-10 等,研究表明血清 TNF- α 、IL-8 和 IL-2 水平是作为脓毒症早期诊断和治疗的指标^[2],有效阻断炎症细胞的释放及炎性递质的生成是救治脓毒症的关键。

本研究将应用高通量的方法检测多细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、MCP-1、MIP-1 β 、TNF- α 在脓毒症患者血清中的含量变化,结合与脓毒症关系密切的白细胞、CRP、PCT 等炎症因子进行分析,探索以重症感染为代表的急诊危重症疾病过程中免疫的紊乱关系,进一步了解脓毒症炎症过程与细胞因子水平变化的相关性,为临床研究和应用提供更多有价值的信息。

1 材料和方法

1.1 一般资料

本研究为回顾性研究,收集 2012-01—2017-06 期间入住我院急诊科已确诊脓毒症患者 112 例,男 64 例,女 58 例。同期正常体检对照组 40 例,所有患者诊断均符合《第三届国际脓毒症与脓毒症休克定义共识 Sepsis 3.0》^[1] 对于脓毒症更新的诊断标准,并排除孕妇、年龄 <18 周岁、近一年内有口服他汀类降脂药物、病史资料不全、中途自动出院的患者。本研究获得患者或指定临床代理人知情同意,已通过上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会批准。

1.2 方法

收集受试者入院 24 h 内的血液标本 5 ml,离心后留取血清,放于 -80°C 冰箱冻存。所用试剂及耗材为: BIO-RAD Human Cytokine Assays kit, Luminex Bio-plex 悬液芯片系统(美国 Bio-Rad 公司)。具体步骤如下:室温下解冻样本并充分混匀,备板,洗板 2 次。避光,常温孵育 30 min。孵育剩余 10 min 时,涡旋 10 倍抗体 5 s,取 300 μl 抗体加入 2700 μl 抗体稀释液,共 3000 μl 。孵育完成后,洗板 3 次。涡旋稀释后的检测抗体,每个孔加入 25 μl 。孵育 30 min,同时打开 Bio-plex 软件。孵育剩余 10 min 时,涡旋 100 倍荧光标记物 SA-PE 5 s,取 60 μl 加入 5940 μl Assay buffer 中,整个过程避光。洗板 3 次。涡旋稀释后的 SA-PE,每孔加入 50 μl 。孵育 10 min。洗板 3 次。每个孔板加入 Assay buffer 125 μl ,孵育 10 s。读板。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。进行数据正态性检验,正态数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;非正态数据采用中位数(四分位数间距)[M(QR)]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料采用 Fisher's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症组与正常对照组临床资料比较分析

两组患者的临床特征比较显示性别构成、年龄、总胆红素在两组间均无明显差异,而白细胞计数、血肌酐、谷丙转氨酶、CRP、PCT、低密度脂蛋白显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、白蛋白在脓毒症组要显著低于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

表 1 脓毒症组与正常对照组基本情况比较分析

指标	脓毒症组($n=112$)	正常组($n=40$)	P
男性/例(%)	64(57.1%)	33(65.0%)	0.46
年龄/岁	65.0 \pm 18.2	62.0 \pm 10.4	0.10
白细胞/ $(10^9 \cdot \text{L}^{-1})$	10.89(7.87~17.64)	5.70(5.18~9.34)	<0.01
CRP/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	89.50(46.70~146)	0.69(0.60~3.70)	<0.01
TG/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	1.07(0.83~1.56)	1.75(0.92~2.20)	0.04
TC/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	3.53(3.30~4.26)	4.57(4.00~5.36)	<0.01
HDL-C/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.83(0.61~1.18)	1.13(0.98~1.27)	<0.01
LDL-C/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	1.78(1.32~2.34)	2.90(1.95~3.45)	<0.01
白蛋白/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	30.30(26.70~34.40)	45.50(43.50~47.50)	<0.01
血肌酐/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	75.60(52.80~124.60)	71.70(59.80~75.10)	<0.01
ALT/ $(\text{u} \cdot \text{L}^{-1})$	29.00(16.00~64.00)	25.00(15.00~27.00)	<0.01
总胆红素/ $(\text{u} \cdot \text{L}^{-1})$	11.10(6.70~18.60)	11.30(8.70~13.60)	0.70
PCT/ $(\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	2.02(0.24~5.98)	0.02(0.01~0.38)	<0.01

2.2 脓毒症组与正常对照组血清细胞因子检测结果

脓毒症组以及正常对照组检测出的 17 个细胞因子结果比较分析见表 2。脓毒症组趋化因子 MCP-1、MIP-1β、IL-8 显著高于正常对照组 (P<0.01,图 1)。同样集落刺激因子及肿瘤坏死因子 G-

CSF、G-CSF、TNF-α 也显著高于正常对照组 (P<0.05)(图 2)。细胞因子 IL-4、IL-6、IL-7、IFN-γ、IL-2、IL-10、IL-12、IL-13 显著高于正常对照组 (P<0.05,图 3)。两组患者的细胞因子比较显示 IL-1β、IL-5、IL-17 在两组间均差异无统计学意义 (图 4)。

表 2 脓毒症组与正常对照组细胞因子比较分析

细胞因子	脓毒症组(n=112)	正常组(n=40)	pg/ml, $\bar{x} \pm s$	P
IL-1β	0.27±1.17	0.45±0.27		0.19
IL-2	8.99±55.90	0.01±0.04		<0.05
IL-4	0.39±1.76	0.06±0.03		<0.01
IL-5	0.47±3.15	0.01±0.02		0.09
IL-6	68.71±235.7	0.27±0.94		<0.01
IL-7	2.30±13.82	0.11±0.46		<0.05
IL-8	194.54±1044.10	2.55±4.95		<0.01
IL-10	54.27±253.98	0.01±0.07		<0.01
IL-12	29.68±184.20	0.51±1.84		<0.01
IL-13	1.08±5.78	0.79±0.25		<0.05
IL-17	5.74±14.33	4.46±13.11		0.58
G-CSF	3.51±7.88	0.41±0.92		<0.01
GM-CSF	26.30±95.58	2.33±13.79		<0.01
IFN-γ	117.84±575.1	10.46±23.46		<0.01
MCP-1	49.10±167.30	8.78±16.66		<0.05
TNF-α	5.02±31.60	0.10±0.36		<0.01
MIP-1β	235.59±460.20	58.82±52.65		<0.01

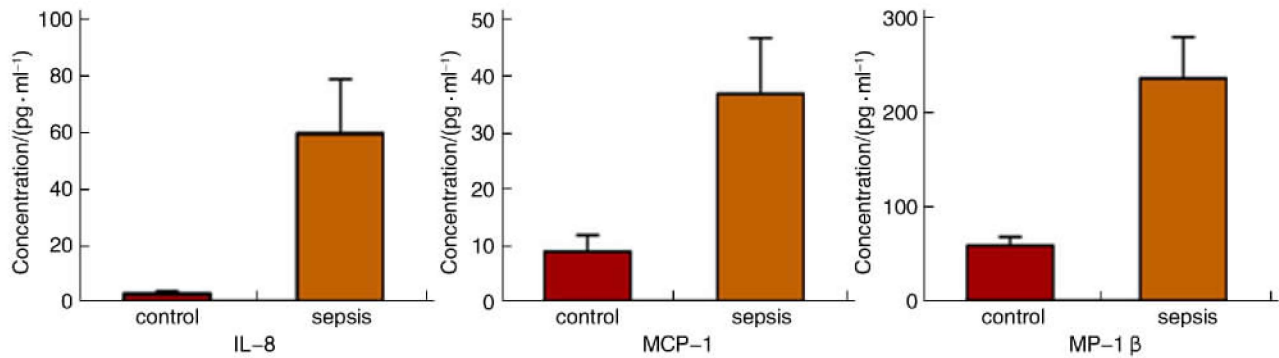


图 1 血清趋化因子比较

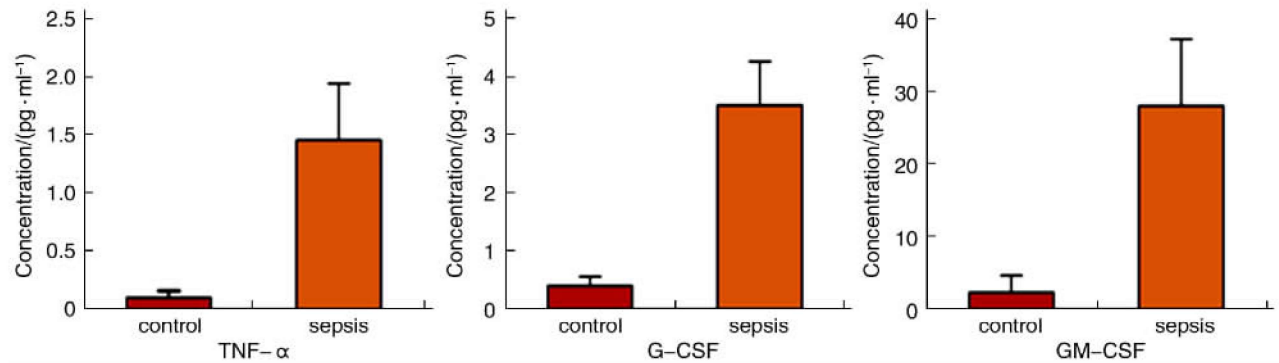


图 2 集落刺激因子及肿瘤坏死因子

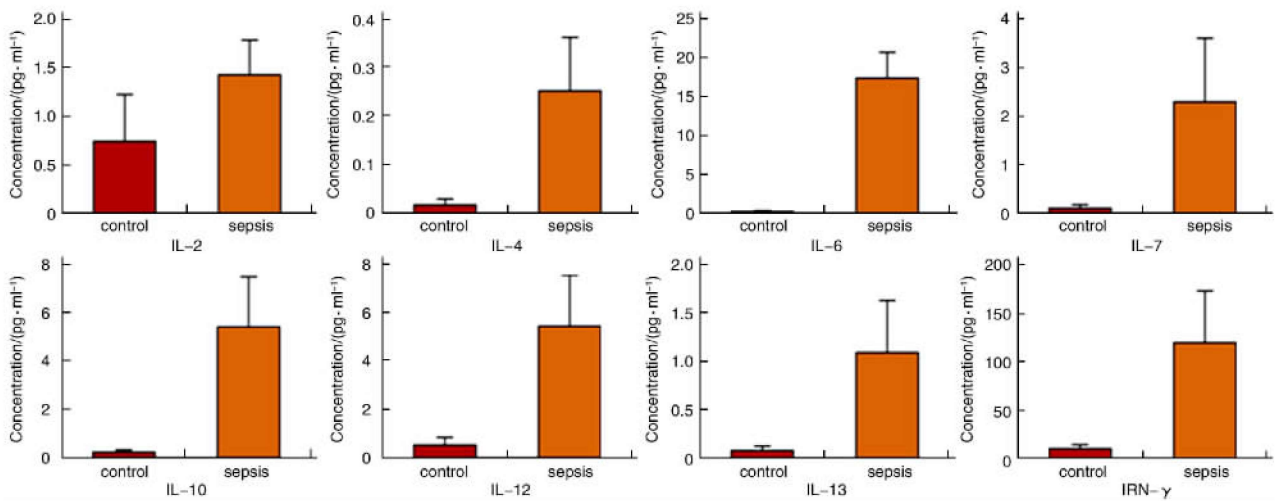


图 3 血清细胞因子

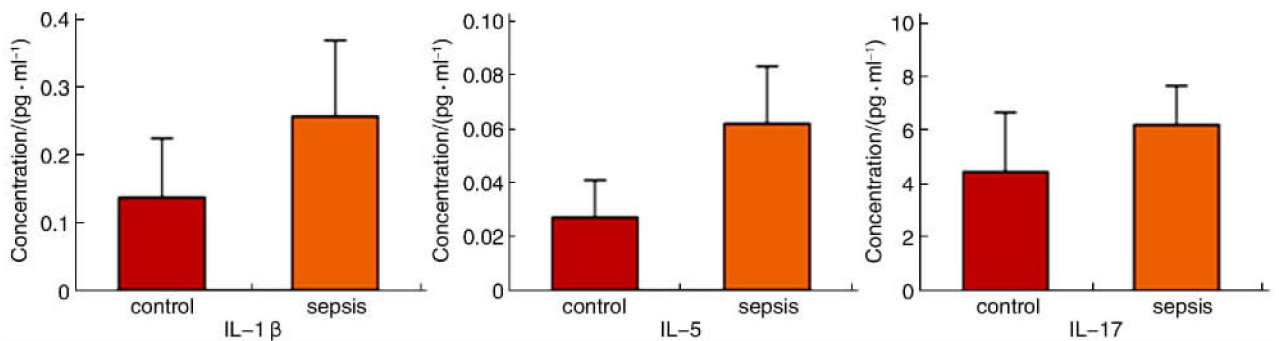


图 4 血清细胞因子

3 讨论

脓毒症的病理生理过程主要涉及炎症反应及免疫功能改变,在感染发病和疾病过程都有许多细胞因子参与了炎症发生发展。目前临床上对脓毒症的血清炎症标志物的相关研究主要包括 PCT、CRP、乳酸等^[3-6]。本研究中两组患者临床资料显示白细胞计数、肌酐、谷丙转氨酶、CRP、PCT、低密度脂蛋白显著高于正常对照组,甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、白蛋白在脓毒症组要显著低于正常对照组,说明脓毒症早期血清炎症标志物 CRP、PCT 明显升高,并且会出现脏器功能损伤,也为临床早期诊断、积极预防脏器损伤和改善预后提供依据。

目前 TNF-α 和 IL-1 是研究最为广泛的促炎因子之一,可介导其他多种促炎因子的激活^[7-8]。TNF-α 作为重要的炎症启动因子,可启动如 IL-1、IL-6 等多种炎症因子的表达和分泌,在脓毒症早期炎症反应中发挥重要的作用,同时 IL-1 和 IL-6 可诱导补体的产生并在炎症反应中起到调理作用^[9],研究发现^[10] IL-6 在脓症患者住院 72 h 的变化可能对疾病预后具有指导作用,也有许多具有抗炎性的细胞因子负责炎症反应的调节,如 IL-10^[11], IL-10

最初被认为是由 CD4 产生的 Th2 型细胞因子,具有抑制 Th1 应答的作用,已证实树突状细胞、B 细胞、巨噬细胞、CD4 T 细胞、CD8 T 细胞、NK 细胞等多种细胞都能产生 IL-10,研究表明 IL-4 可以在转录水平一直促进 IL-10 的产生,尽管 IL-4 对 IL-10 的抑制作用相当大,但 IL-4 并不能完全抑制 IL-10 的基因表达。同样,IL-4 可以间接抑制 IL-1、IL-6、TNF-α 的产生。IL-17 家族的促炎性质是近期才被发现的,由 Th17 细胞合成以及分泌,能刺激其他促炎因子如 IL-1、IL-6 等的合成,同时还能介导淋巴细胞和巨噬细胞间的交互作用^[12-13]。可见,不同细胞因子在免疫反应的不同阶段起着不一样的作用,同一个细胞因子在整个免疫应答过程也发挥着不同的作用。在本研究中,细胞因子 IL-4、IL-6、IFN-γ、IL-10 在脓毒症组均有较高水平的表达,与既往研究一致,可能说明这些细胞因子对脓毒症的早起诊断有指导意义,而 IL-1β 并未像既往研究的那样有着较高水平的表达,可能需要进一步的实验验证,进一步探讨它的作用机制。

脓毒症相关的其他促炎因子还包括 IL-12、IFN-γ 以及趋化因子 IL-8、MIP-1 和细胞集落刺激因子 G-CSF、GM-CSF 等,趋化因子是一类控制多

种细胞定向迁移、活化和趋化效应的细胞因子家族,参与免疫细胞和器官的发育、免疫应答过程、病原体感染与清除、肿瘤形成和转移等,在机体发挥重要的病理生理效应^[14]。近年来,趋化因子系统在神经系统疾病中的作用成为研究的热点^[15],本研究检测了趋化因子中的 MIP-1、MCP-1 以及 IL-8 在脓毒症患者血清浓度,结果显示在脓毒症患者中趋化因子均较正常对照组有显著提高。通过脓毒症组和细胞因子组热图对比,可见脓毒症组中多种细胞因子显示高值,正常对照组大部分显示蓝色低值,尤其 IL-8、MCP-1、MIP-1b 对比明显,可见这些细胞因子、趋化因子以及集落刺激因子与脓毒症发生发展密切相关,在脓毒症的炎症反应过程伴随大量细胞因子产生,这些细胞因子在脓毒症早期有升高,可能对脓毒症的早期诊断有一定的指导意义。

本研究进一步验证了脓毒症“细胞因子风暴”之说,大量细胞因子、趋化因子、集落刺激因子产生,为脓毒症的发生发展提供依据,然而在此次研究中,IL-1 β 、IL-5 以及 IL-17 并未像其他研究者研究中表现出明显差异,这可能是其他细胞因子如 IL-4、IL-10 参与了明显的抑制过程有关,这也说明脓毒症细胞因子有待进一步的研究,可以增加时间宽度以及扩展多中心实验来进一步完善探究。

脓毒症患者开始处于一种炎症激活状态,而随着病情的进一步发展可能进入免疫抑制状态,也可能自始至终集体都一直处于免疫紊乱状态,进一步阐明免疫功能障碍的确切机制,明确各个细胞因子在不同分阶段发挥的作用,可通过对细胞因子及其受体抑制剂的研究,为临床中脓毒症并发症的早期诊断和合理防治开辟新途径,而且通过筛选出有意义的细胞因子,进一步记录一个动态变化的过程,结合患者的临床资料,筛选出针对不同脏器有意义的细胞因子,必要时联合检测,争取为脓毒症的早期诊断和预后的改善做出贡献,进一步降低患者死亡率,减轻医疗负担,为社会发展做贡献。

参考文献

[1] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315: 801-810.

[2] Urbonas V, Eidukait A, Tamulien I. The diagnostic value of interleukin-6 and interleukin-8 for early pre-

diction of bacteremia and sepsis in children with febrile neutropenia and cancer [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2012, 34: 122-127.

[3] Cesar Henriquez-Camacho, Juan Losa. Biomarkers for Sepsis [J]. Bio Med Res Int, 2014; 547818-547818.

[4] 付源伟. 预测严重脓毒症及感染性休克预后的生物标记物研究进展 [J]. 中国急救医学, 2016, 36(3): 219-223.

[5] Lee H, Busan, Korea, et al. Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases [J]. Korean J Intern Med, 2013, 28: 285-291.

[6] 周发伟, 唐鲜娥, 寿松涛. 降钙素原指导脓毒症患者抗生素应用的荟萃分析 [J]. 中国急救医学, 2016, 36(3): 228-233.

[7] Van der Poll T, Opal S M. Host-pathogen interactions in sepsis [J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8: 32-43.

[8] Castellheim A, Brekke O L, Espevik T, et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis [J]. Scand J Immunol, 2009, 69: 479-491.

[9] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response [J]. Nature, 2007, 449: 819-826.

[10] Ricarte-Bratti J P, Brizuela N Y, Jaime-Albarran N, et al. IL-6, MMP 3 and prognosis in previously healthy sepsis patients [J]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2017, 74: 99-106.

[11] Opal S M, DePalo V A. Anti-inflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 117: 1162-1172.

[12] Bozza F A, Salluh J I, Japiassu A M, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis [J]. Crit Care, 2007, 11: R49-R49.

[13] Waever C T, Hatton R D, Mangan P R, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 821-852.

[14] Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, et al. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases [J]. Endocr Rev, 2007, 28: 492-520.

[15] Ramesh G, MacLean A G, Philipp M T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuro-pathic pain [J]. Med Inflamm, 2013, 2013: 480739-480739.

(收稿日期: 2017-11-17)