

• 短篇论著 •

# 多器官功能障碍综合征患者病情发展不同阶段中性粒细胞功能的变化

## Changes of polymorphonuclear neutrophil function at different stages of patients with multiple organ dysfunction syndrome

林福清, 邓小明\*, 李金宝, 朱科明, 许平波, 江 来, 万小健

(第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**研究多器官功能障碍综合征(MODS)患者病情发展不同阶段[全身炎症反应综合征(SIRS)期、MODS期]外周血中性粒细胞(PMN)功能的变化,并探讨其与MODS病情演进的关系。**方法:**采用流式细胞仪对10例具有明显SIRS、MODS分期患者的外周血PMN进行趋化、吞噬、呼吸爆发功能检测,观察分析其功能变化,比色法检测血清中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)活性,血细胞分析仪分类计数白细胞并测定髓过氧化物酶(MPO)活性,ELISA法检测TNF- $\alpha$ 、IL-8水平,硝酸还原比色法检测NO水平,并进行危重度评分。同时以8例健康志愿者作为对照组。**结果:**与健康对照组相比,SIRS期患者外周血PMN趋化、吞噬、呼吸爆发功能明显增强( $P < 0.01$ ),而MODS期PMN的趋化、吞噬功能障碍( $P < 0.01$ ),呼吸爆发功能显著增强( $P < 0.01$ )。白细胞计数、NE活性、MPO活性以及TNF- $\alpha$ 、IL-8、NO水平变化及APACHE III评分为MODS期 $>$ SIRS期 $>$ 健康对照组( $P < 0.01$ )。PMN趋化功能变化与血浆NO水平呈负相关( $r = -0.86, P < 0.01$ )。**结论:**MODS期患者外周血PMN趋化、吞噬功能障碍,即参与先天免疫反应功能下降,但其呼吸爆发功能显著增强,释放生物活性物质增多,加重自身组织的损伤,病情进一步恶化。

**[关键词]** 多器官功能障碍综合征;全身炎症反应综合征;中性粒细胞

**[中图分类号]** R 365 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0557-03

自从1991年美国ACCP/SCCM联席会议提出全身炎症反应综合征(SIRS)的诊断标准以来,人们对多器官功能障碍综合征(MODS)有了更深的认识。目前人们普遍认为,MODS是由SIRS演变发展而来,而多器官功能衰竭(MOF)是MODS发展的终末期最严重的后果。在出现器官功能障碍前,患者多有应激反应表现和难以控制的全身炎症反应,此时,机体防御反应的最大特点是非特异性的炎症反应亢进,特异性的免疫细胞功能却下降。大量的炎细胞被激活并释放大量的炎症介质,这些炎症介质又导致炎细胞的活化,二者互为因果,形成炎症瀑布。

中性粒细胞又称多形粒细胞(PMN),是人体重要的炎症细胞之一,其在MODS致病机制中的作用逐渐受到人们的重视。Baker等<sup>[1]</sup>在其研究中发现脓毒症患者的PMN功能发生变化,丧失防御能力,使机体更容易感染,同时作为炎性细胞释放炎症介质造成自身组织、器官损伤。Mollinedo等<sup>[2]</sup>在研究中发现,激活的PMN的表面标志和功能会发生改变,但是目前尚不能明确PMN的功能变化是否也会随着机体免疫功能的改变而相应的改变。本研究拟通过检测SIRS期、MODS期患者外周血中PMN的趋化、吞噬、氧化呼吸爆发功能以及血清中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)活性、髓过氧化物酶(MPO)活性及某些细胞因子含量的变化,探讨PMN在MODS病情演进中的作用。

### 1 资料和方法

1.1 一般资料 选取2004年5月至2005年12月我院ICU病房10例具有明显SIRS、MODS分期的患者,其中上消化道穿孔术后3例,肠梗阻术后2例,化脓性胆管炎术后3例,多发伤2例。男女各5例,年龄16~84岁,平均(59.8 $\pm$

3.4)岁。所有患者入ICU当日均符合SIRS诊断标准。入室后给予ICU常规监护、抗感染、抗炎、营养支持及其他对症治疗等,同时每天进行APACHE及各器官功能损害评分。在ICU住院期间血标本病原微生物培养均为阳性,其中包括铜绿假单胞菌4例、鲍曼不动杆菌3例、大肠埃希菌2例,金黄色葡萄球菌感染1例,有4例合并真菌感染,白念珠菌和光滑念珠菌各2例。10例患者的ICU住院天数为5~60d,平均28d,从诊断SIRS到MODS确诊间隔3~8d,平均5d。所有患者最终都死于MOF。

8例健康志愿者作为健康对照组,平均年龄(25.4 $\pm$ 4.2)岁,其中男性6例,女性2例,均无慢性炎症病史,在抽血前1个月无急性炎症发作病史。

#### 1.2 诊断标准

1.2.1 SIRS诊断标准 根据1991年美国ACPP/SCCM推荐的标准:(1)体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$ ;(2)心率 $>90$ 次/min;(3)过度通气,表现为呼吸频率 $>20$ 次/min,或 $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg(1 mmHg=0.133 kPa);(4)白细胞计数 $>12 \times 10^9/\text{L}$ 或 $<4 \times 10^9/\text{L}$ 。具备其中两项以上可以诊断为SIRS。

1.2.2 MODS的诊断标准 根据第三届全国急救学术会议上讨论通过的标准,而且符合在机体遭受打击24h后序贯出现2个或2个以上器官功能不全<sup>[3]</sup>。

1.3 PMN功能检测 所有患者均于SIRS期、MODS期确诊后24h内各取外周静脉血3ml,肝素(50 IU/ml)抗凝,采用流式细胞仪(FACFCalibur,美国BD公司)全血法检测PMN趋化功能、吞噬功能及氧化呼吸爆发功能,同时测定健

[作者简介] 林福清,硕士,医师. E-mail: xiaolinlang@163.com.cn  
\* Corresponding author. E-mail: xmdeng@anesthesia.org.cn

康志愿者外周 PMN 的功能作为正常值参照。

1.4 NE 活性测定 血清中 NE 活性的测定采用比色法测定。Methoxysuccinyl-alanyl-alanyl prolyl valine-p-nitroanilide(MEOSAAPVNA, 购于 Sigma 公司)是 NE 的一种特异性的合成荧光底物。在 96 孔板中每孔加入 0.1 ml 底液,含有 0.2 mmol/L 的 MEOSAAPVNA、0.1 mmol/L HEPES、0.5 mmol/L NaCl、0.1% Brij、2% 二甲基亚砷, pH 值为 7.5。用分光光度计在 405 nm 测定基础光密度值(D)。然后加入 0.08 ml 血清, 盖上铝箔, 25℃ 孵育 2 h, 然后再测 D<sub>405</sub>。用已知浓度的人纯化 NE 为标准品绘制标准曲线。根据标准曲线计算样品的 NE 活性<sup>[4]</sup>。

1.5 白细胞分类计数、MPO 活性指数 (myeloperoxidase activity index, MPXI) 测定 ADVIA 120 全自动血细胞分析仪及其配套试剂, 仪器校准品和质控品均由德国 Bayer 公司提供。ADVIA 120 血细胞分析仪采用流式细胞分析原理, 依据不同白细胞的光散射强度和 MPO 酶活性分类计数各种白细胞。仪器分类计数白细胞的同时测定中性粒细胞 MPO

活性, 以 MPXI 表示, 在 ±10 范围内为活性正常, +10~+20 为活性轻度增强, +20~+30 为活性明显增强, 大于 +30 为活性极度增强, 小于 -10 为活性减弱。

1.6 血清 TNF-α、IL-8、NO 水平检测 血清 TNF-α、IL-8 测定应用 ELISA 法, NO 测定采用硝酸还原比色法。按照试剂盒说明书操作。试剂盒均购自上海晶美生物公司。

1.7 危重度评分 所有患者均于 SIRS 期、MODS 期采集其临床资料, 运用软件动态分析 APACHE III 评分。

1.8 统计学处理 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SAS8.01 软件包进行统计学分析, 组间两两比较采用方差分析, 两变量间的相关性用 Spearman 等级相关分析法。

2 结果

2.1 PMN 功能变化 与健康对照组相比, SIRS 期患者外周血 PMN 的趋化、吞噬、氧化呼吸爆发功能均明显增强 (P<0.01), 而 MODS 期患者外周血 PMN 上述功能又显著强于 SIRS 期 (P<0.01)。见表 1。

表 1 MODS 患者不同时期 PMN 趋化、吞噬、氧化呼吸爆发呼吸功能的变化

组 别	n	趋化 PMN 数	PMN 的噬菌率 (%)	PMN 氧化呼吸爆发率 (%)
健康对照组	8	4 556 ± 324	63.77 ± 2.67	66.53 ± 2.88
SIRS 期	10	9 654 ± 282**	96.08 ± 2.03**	43.58 ± 3.75**△△
MODS 期	10	3 438 ± 437**△△	89.56 ± 2.63**	97.53 ± 1.48**△△

\*\* P<0.01 与健康对照组比较; △△ P<0.01 与 SIRS 期比较

2.2 血浆 NE 活性变化 血浆 NE 活性随着病情的发展逐渐增强, 即 MODS 期 > SIRS 期 > 健康对照组。SIRS 组、

MODS 组与健康对照组比, 差异显著 (P<0.01)。MODS 组与 SIRS 组比, 差异显著 (P<0.01)。见表 2。

表 2 MODS 患者不同时期血浆 NE 活性及细胞因子水平变化

组 别	n	NE 活性 (c <sub>B</sub> /nmol · L <sup>-1</sup> )	TNF-α (p <sub>B</sub> /pg · ml <sup>-1</sup> )	IL-8 (p <sub>B</sub> /pg · ml <sup>-1</sup> )	NO (c <sub>B</sub> /μmol · L <sup>-1</sup> )
健康对照组	8	0.633 ± 0.137	40.25 ± 8.14	115.63 ± 18.91	58.91 ± 9.80
SIRS 期	10	2.841 ± 0.197**	366.00 ± 58.54**	1 278.40 ± 328.73**	125.37 ± 28.99**
MODS 期	10	4.823 ± 0.219**△△	760.01 ± 115.90**△△	2 540.10 ± 425.05**△△	247.28 ± 46.43**△△

\*\* P<0.01 与健康对照组比较; △△ P<0.01 与 SIRS 期比较

2.3 白细胞分类计数及 MPXI 测定 与健康对照组相比, SIRS 组及 MODS 组患者白细胞计数均明显增加 (P<0.01), MODS 组与 SIRS 组比, 差异显著 (P<0.01)。所有健康志愿

者的 MPXI 都在 ±10 范围内, SIRS 期所有患者的 MPXI 在 +20~+30 范围内, MODS 期患者的 MPXI 均大于 +30。见表 3。

表 3 MODS 患者不同时期 PMN 计数及 MPXI 的变化

组别	n	WBC (×10 <sup>9</sup> /L)	PMN 计数	MPXI [范围 (中位数)]
健康对照组	8	6.3 ± 3.2	0.692 ± 0.079	-6 ~ +9 (+5)
SIRS 期	10	14.5 ± 3.4**	0.914 ± 0.104**△△	+20 ~ +30 (+26)
MODS 期	10	16.5 ± 4.7**△△	0.945 ± 0.118**△△	+32 ~ +39 (+38)

\*\* P<0.01 与健康对照组比较; △△ P<0.01 与 SIRS 期比较

2.4 血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-8、NO 水平变化 血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-8、NO 水平随着病情的发展逐渐增高,SIRS 组、MODS 组与健康对照组相比,差异显著( $P < 0.01$ )。MODS 组与 SIRS 组相比,差异显著( $P < 0.01$ )。见表 2。PMN 趋化功能变化与血浆 NO 的水平呈负相关( $r = -0.86, P < 0.01$ )。

2.5 危重度评分结果 健康对照组的 APACHE III 评分为 0,SIRS 期患者的 APACHE III 评分  $49.8 \pm 18.3$ ,MODS 期患者的 APACHE III 评分  $80.3 \pm 25.6$ ,MODS 期与 SIRS 期相比,差异显著( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

在 MODS 时,PMN 主要通过呼吸爆发(释放氧自由基)和脱颗粒(释放多种蛋白酶)而损伤自身组织。激活的 PMN,在多种介质和细胞因子的作用下,发生氧化呼吸爆发,产生大量的活性氧(ROS)代谢产物,如羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、单线态氧( $O_2 \cdot$ )、次氯酸( $HOCl$ )和超氧阴离子( $O_2 \cdot^-$ );同时释放多种造成组织损伤的物质包括各种蛋白酶(胶原酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶)、脂类物质(白三烯、血小板活化因子)和炎性细胞因子等。特别是 PMN 氧化呼吸爆发产生的大量活性氧代谢产物,具有强烈的细胞组织损伤作用:(1)通过脂质过氧化反应,损伤生物膜脂质,导致脂质过氧化损伤;(2)通过对蛋白质的交联,使肽键发生断裂或改变蛋白构型和酶活性等损伤膜蛋白;(3)直接损伤核酸,导致细胞死亡;(4)破坏间质胶原肽键、解聚透明质酸等参与对细胞间质的损伤;(5)破坏超氧化物歧化酶(SOD)活性,消耗氧自由基清除剂,导致机体抗氧化能力下降;(6)损伤血管内皮细胞(VEC)和基底膜,增加血管通透性,引起炎性介质及蛋白渗入组织间隙。本实验证实 SIRS 和 MODS 患者 PMN 氧化呼吸爆发功能明显增强,并且与机体组织器官的损伤有关。

NE 主要来源于激活的 PMN,它的最适底物是弹性蛋白,后者是构成血气屏障细胞外基质的主要成分。除此之外,NE 还能分解补体;活化激肽、缓激肽、凝血-纤溶系统、花生四烯酸等。正常机体有足够的抗蛋白酶原来对抗 NE 的活性,防止正常的组织受到 NE 的过度破坏。本研究中,作者应用了一种简单而且敏感的 NE 活性测定方法,这种方法测定的是游离的激活的尚为被抗蛋白酶结合的 NE,而用放免法或 ELISA 法测定的是机体的 NE 总量,包括已被抗蛋白酶结合的 NE。因此,本方法测定 NE 的活性能真正反映 NE 的活性作用。本研究结果表明,MODS 期、SIRS 期患者血浆中 NE 的活性明显高于健康对照组。说明在 MODS 时 PMN 被

激活,释放大量的 NE,同时释放氧自由基又使  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha_1$ -AT)活性中心蛋氨酸残基氧化失活,从而导致蛋白酶-抗蛋白酶失衡,引起组织损伤<sup>[10]</sup>。

总之,MODS 期患者 PMN 的趋化、吞噬功能障碍,即其参与先天性免疫反应功能下降,增加机体感染的机会,但其呼吸爆发功能仍持续增强,释放的各种酶活性显著增强,促炎因子水平持续增高,加剧自身组织的损伤,影响着病情的发展、转归。对 PMN 功能变化的病理生理机制的进一步研究将有可能对 MODS 的治疗提供理论依据。

### [参考文献]

- [1] Baker C C, Huynh M D. Sepsis in the critical ill patient[J]. *Curr Probl Surg*, 1995, 35:1013-1092.
- [2] Mollinedo F, Borregaard N, Boxer L A. Novel trends in neutrophil structure, function and development [J]. *Immunol Today*, 1999, 20:535-537.
- [3] 王今达,王恩宝.多脏器失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J]. *中国急危重病急救医学*, 1995, 7:346-351.
- [4] 揭志军,罗勇,徐为国,等.急性肺损伤患者血清中中性粒细胞弹性蛋白酶活性的变化[J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14:497-499.
- [5] Van Griensven M, Kuzu M, Breddin M, et al. Polymicrobial sepsis induces organ changes due to granulocyte adhesion in a murine two hit model of trauma[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2002, 54:203-209.
- [6] Tavares-Murta B M, Cunha F Q, Ferreira S H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 124:1369-1374.
- [7] Crosara-Alberto D P, Darini A L, Inoue R Y, et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 136:645-658.
- [8] Tavares-Murta B M, Zaporoi M, Ferriera R B, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30:1026-1061.
- [9] Williams D L, Ha T, Li C, et al. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31:1808-1818.
- [10] Buhl R, Meyer A, Vogelmeier C. Oxidant-Protease interaction in the lung: prospects for antioxidant therapy[J]. *Chest*, 1996, 110:267-272.

[收稿日期] 2006-09-01

[修回日期] 2007-03-28

[本文编辑] 曹静