

严重脓毒症免疫功能监测与调理

如何从基础研究走向临床应用？

解放军总医院第一附属医院
全军烧伤研究所暨急危重症中心

姚咏明 林洪远

转化医学

随着基因组学、蛋白质组学等前沿领域的不断进步与广泛应用，生命科学和高新技术得以迅猛发展。与此同时，也使基础和临床研究的距离加大，生物医学研究产生的许多重要成果未被及时运用于临床实践。因此，致力于弥补基础实验与临床应用之间屏障的转化医学应运而生。

转化医学的提出

- 转化医学理念——1992年 *Science* 倡导;
- “转化医学(translational medicine)”概念——1996年 *Lancet* 正式提出; 2003年NIH路线图计划明确指出建立转化医学中心;
- 从实验室的研究发现转化为临床使用的诊疗技术和方法: “**Bench to Bedside**”;
- 加快基础研究成果向临床实践的转化。

转化医学的概念

- 指将生物医学的实验室研究成果转化为可用于临床的理论、技术、方法和药物，在实验室和临床应用之间架起高速通畅的桥梁；
- 不是单向的、封闭的，而是双向并开放的（“**bench to bedside**”和“**bedside to bench**”）；
- 是循环向上、不断提升的过程，是指导医学研究和发展的根本方针，将成为未来医学主要研究模式。

国际转化医学现状

- 美国设置临床与转化科学基金：**2006年NIH设置CTAS，2008年CTAS投资7亿美元建立转化医学中心（共55家），2~5亿美元/年推进转化医学研究；**
- 英国制定转化医学研究发展战略：**2007年成立健康研究战略协调办公室（OSCHR），成立转化医学委员会和研究中心、国际合作中心；**
- 欧盟建立“欧洲高级转化医学研究机构”：**2007-2013年60亿欧元用于转化型研究。**

转化医学发展途径

- 提高转化意识，牢固树立一切基础研究最终均是为了治病救人的理念；
- 加强学科之间的融合与交叉开放，促进转化医学的高效实施；
- 密切结合临床实际，设计有利于转化应用的研究；
- 推进转化医学中心建设与发展，搭建保障转化的产学研平台。

脓毒症

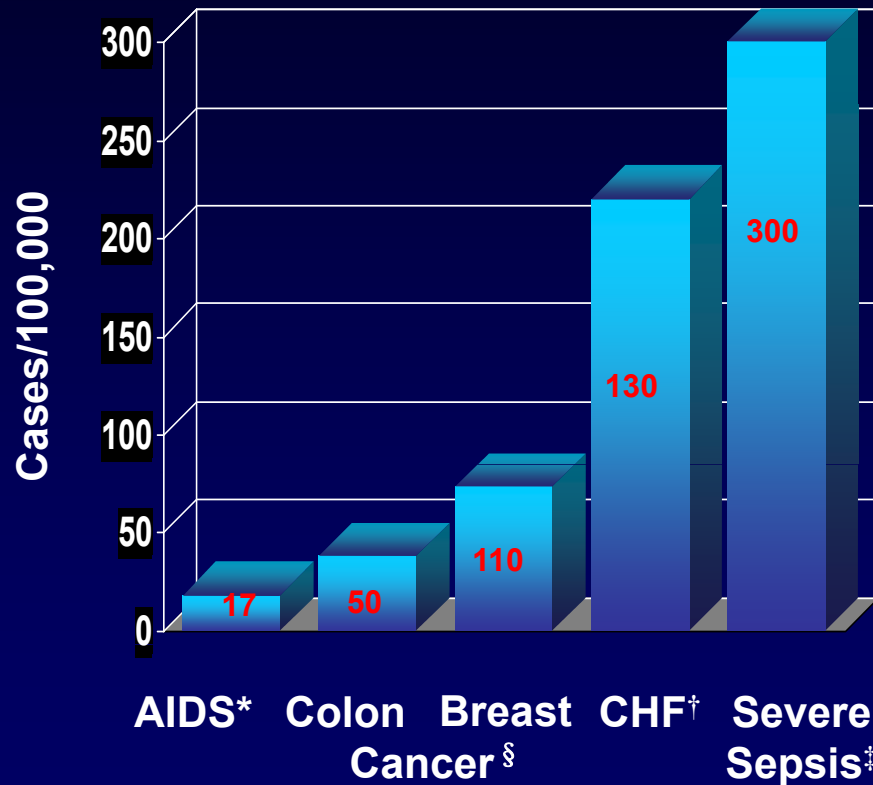
21世纪对人类健康和经济发展的重大挑战

- 全球性的威胁和挑战，患病率约为人口的 3/1000，全球总病例数约1800万/年，相当于丹麦、芬兰、爱尔兰和挪威人口的总和；美国患病人数为75万/年；欧洲为13.5万/年。
- 全世界死亡人数超过1.4万/天；美国21.5万/年，并成为美国非心脏 ICU 死亡的主因。尚有相当的死亡病例没有计算在内，而归咎于原发病。
- 在美国平均治疗费用约\$2.2万/例，年耗资近\$200亿；欧洲年耗资近\$100亿；截至1995年，总研发费用已经超过\$10亿。
- 发病人数正以年1.5%~8%的比例增长；过去10年间，增加病例139%，且有继续增加的趋势。

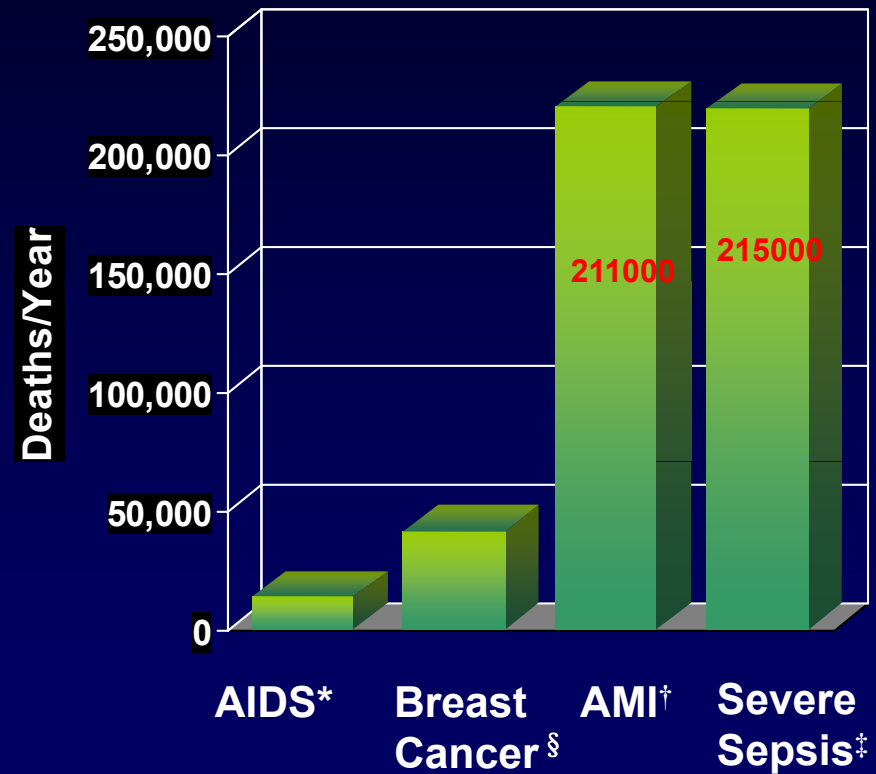
Sands KE et al. *JAMA*. 1997; 278: 234-40; † Based on data for septicemia. Murphy SL. National Vital Statistics Reports. Angus DC et al. *Crit Care Med*. 2001 Reflects hospital-wide cases of severe sepsis as defined by infection in the presence of organ failure.

脓毒症与其他严重病症的比较

脓毒症的发生率

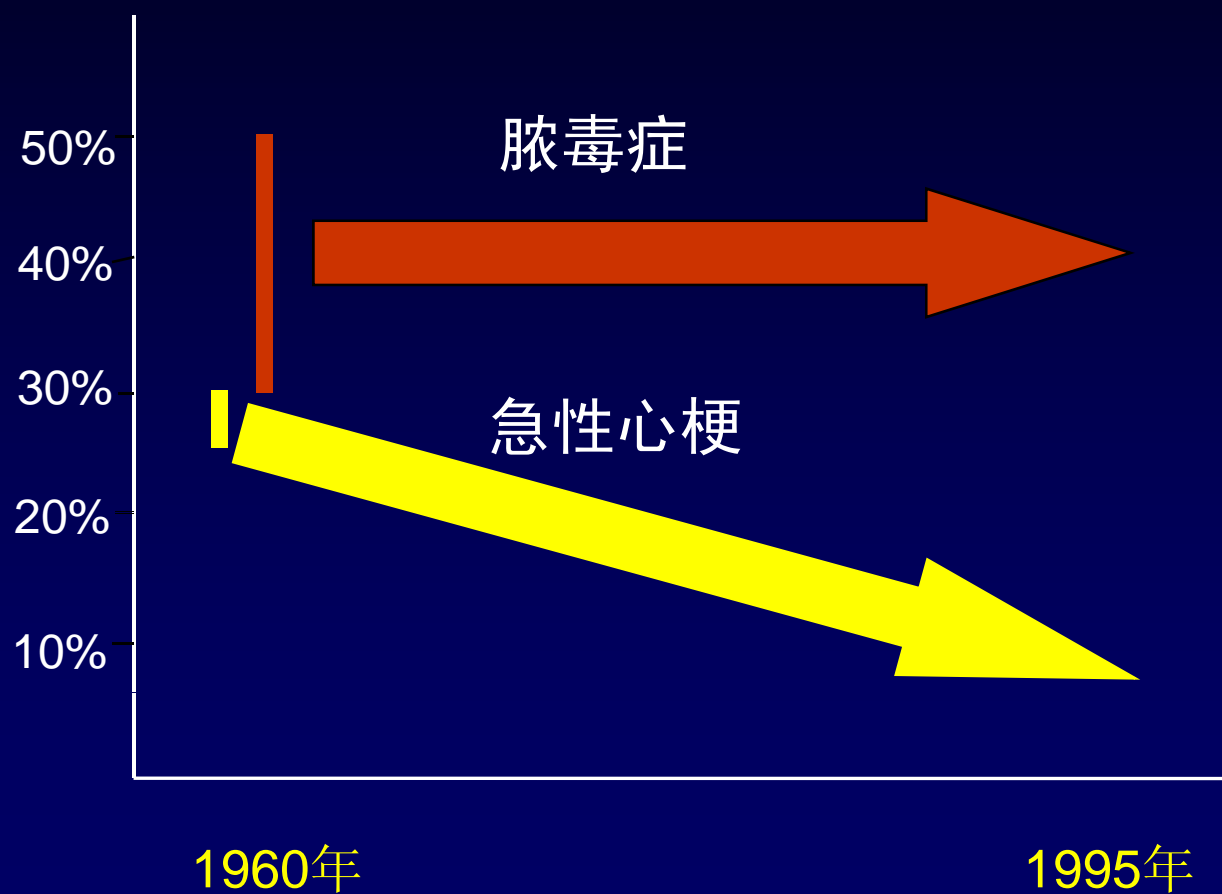


脓毒症的病死率



†National Center for Health Statistics, 2001. § American Cancer Society, 2001. *American Heart Association, 2000. ‡Angus DC et al. *Crit Care Med.* 2001.

脓毒症与急性心梗病死率变化的比较



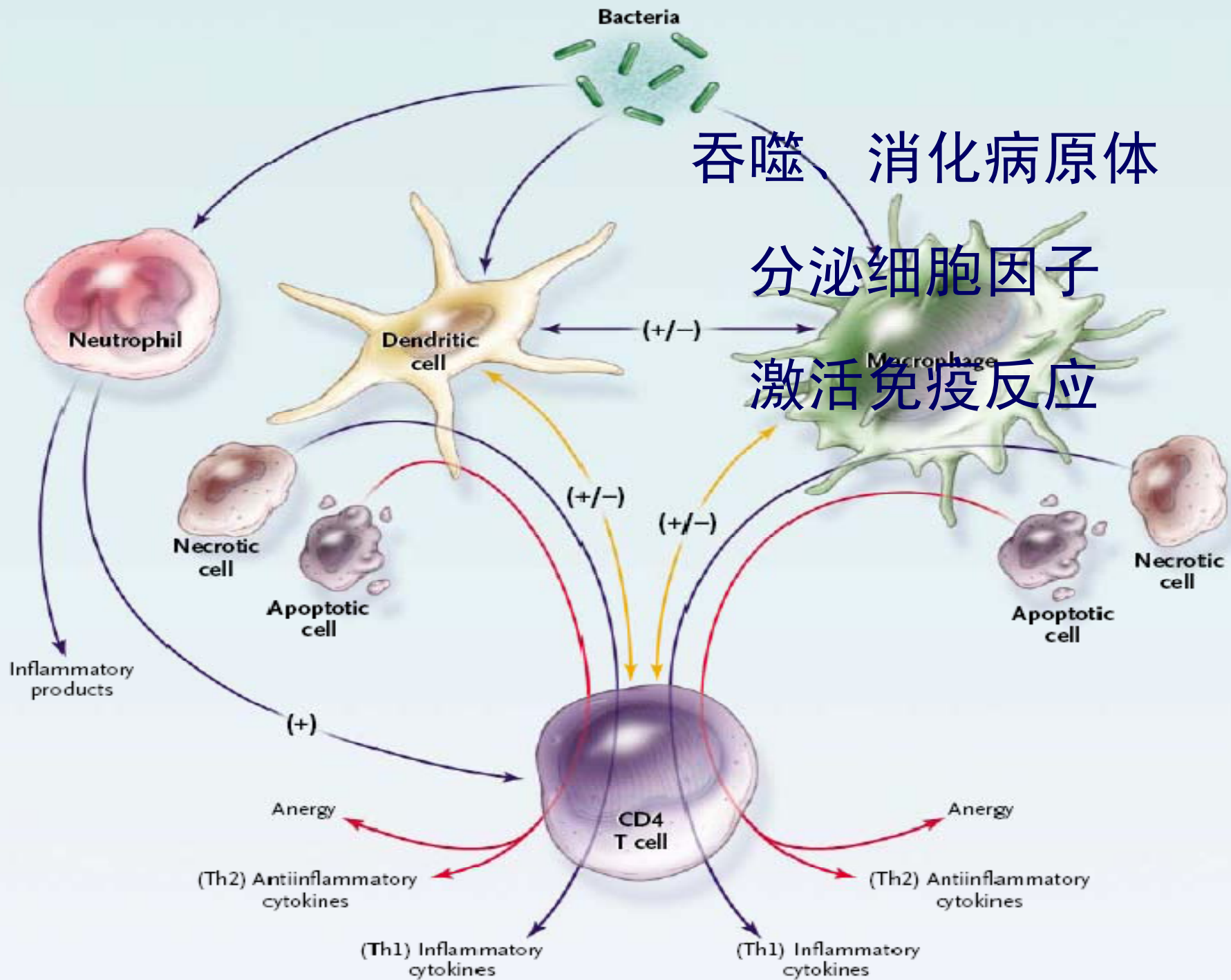
2002年巴塞罗那宣言

全社会要像当年重视“中风”和“急性心梗”一样，重视对脓毒症的研究和治疗，争取把脓毒症的发生率和死亡率降低到可接受的水平（五年时间病死率降低25%）。

脓毒症与炎症及免疫功能紊乱

- ④ 研究证实，免疫功能紊乱在脓毒症发生、发展过程中确实具有重要作用。
- ④ 机体往往有短暂的SIRS，随后是长期的CARS和MARS。SIRS表现为非特异性炎症反应亢进；CARS表现为特异性免疫系统的抑制。

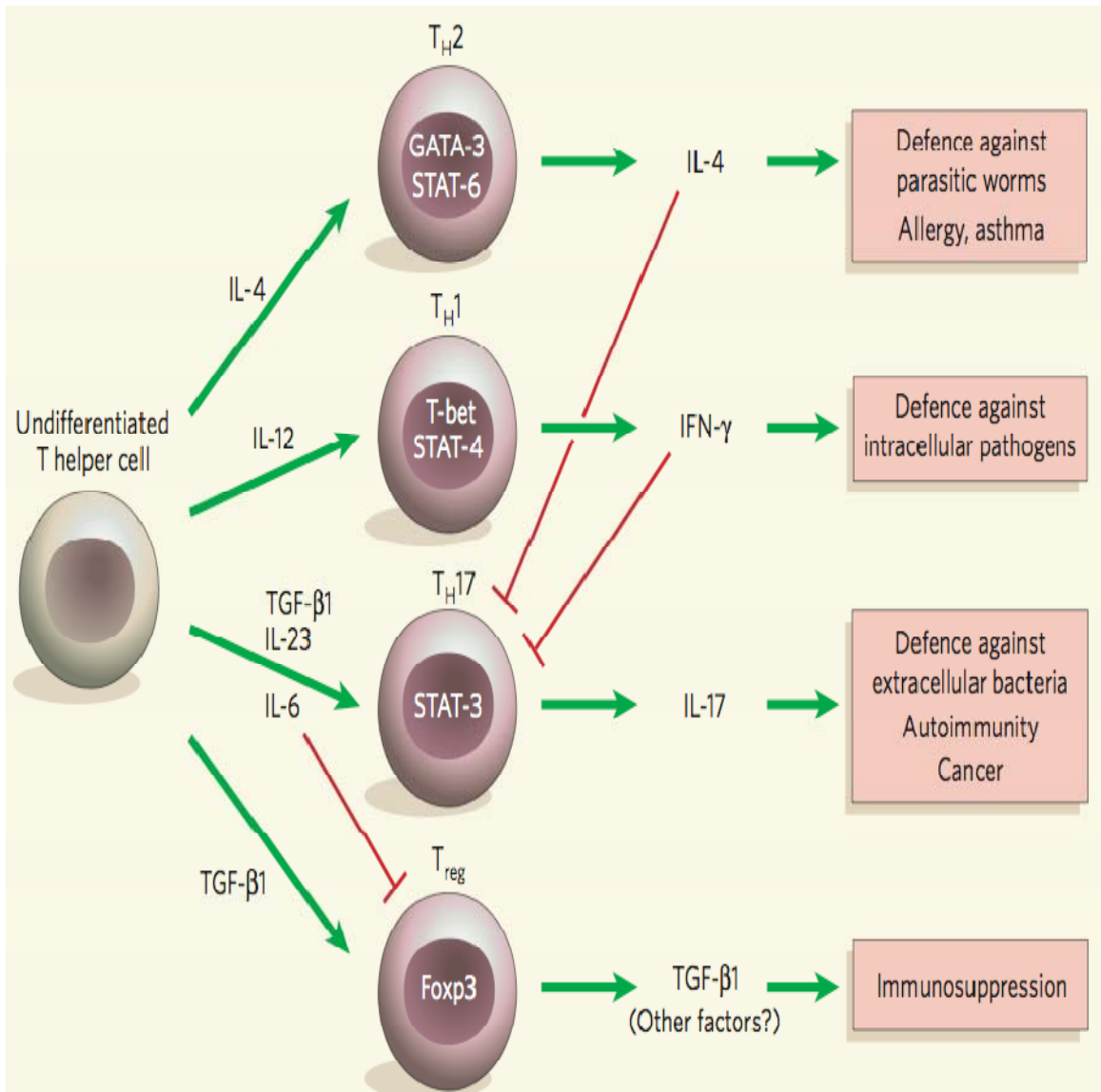




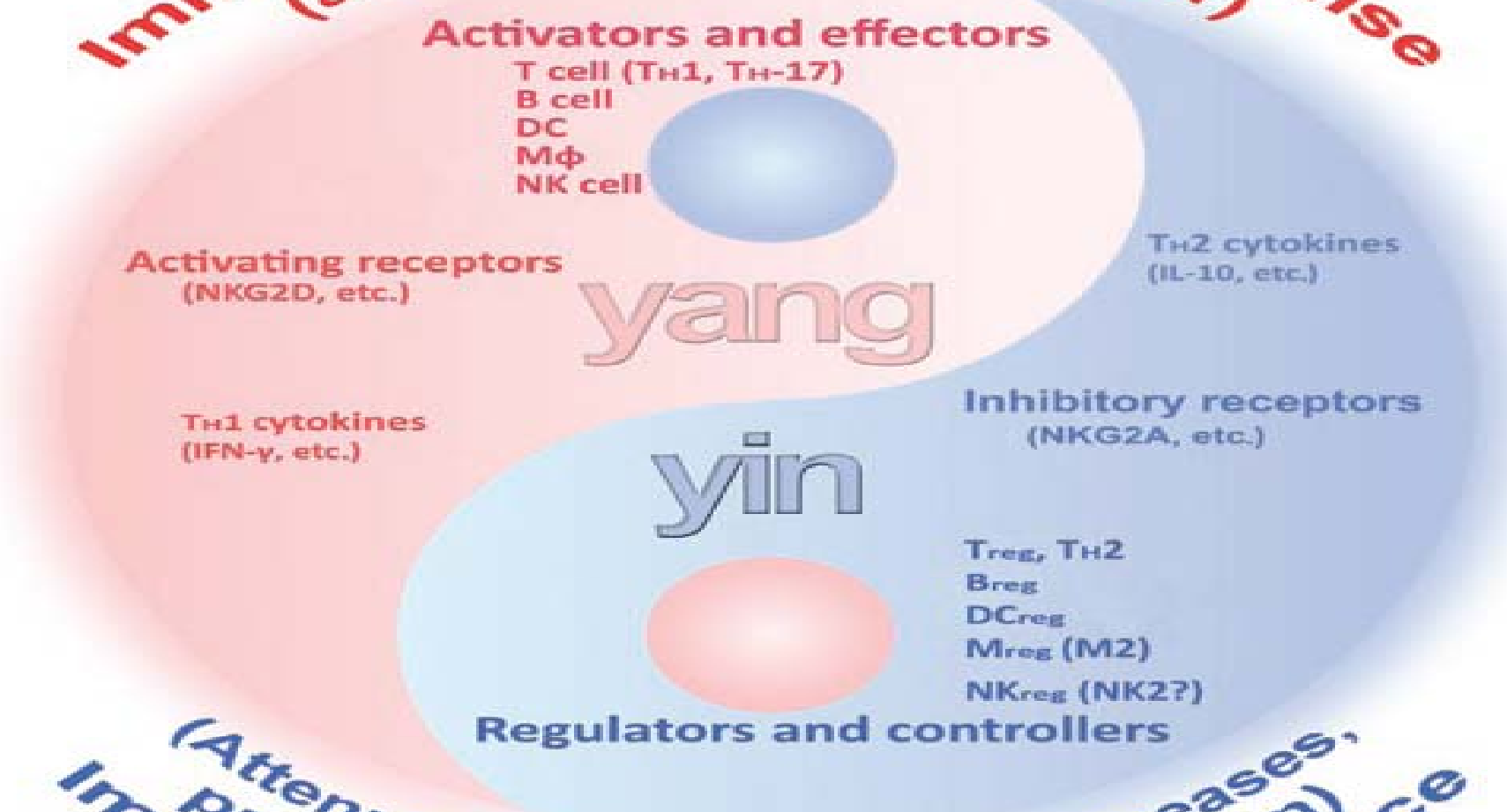
吞噬、消化病原体

分泌细胞因子

激活免疫反应



Immune initiation and response (anti-infection, anti-tumor)



(Attenuating autoimmune diseases, preventing transplant rejection) Immune regulation and tolerance

免疫功能监测及其干预研究

- 中性粒细胞杀菌活性与补体系统
- 单核 / 树突状细胞与HLA-DR表达
- T淋巴细胞免疫反应及其意义
- 新的免疫干预策略及其临床效果

严重打击 (创伤、感染)



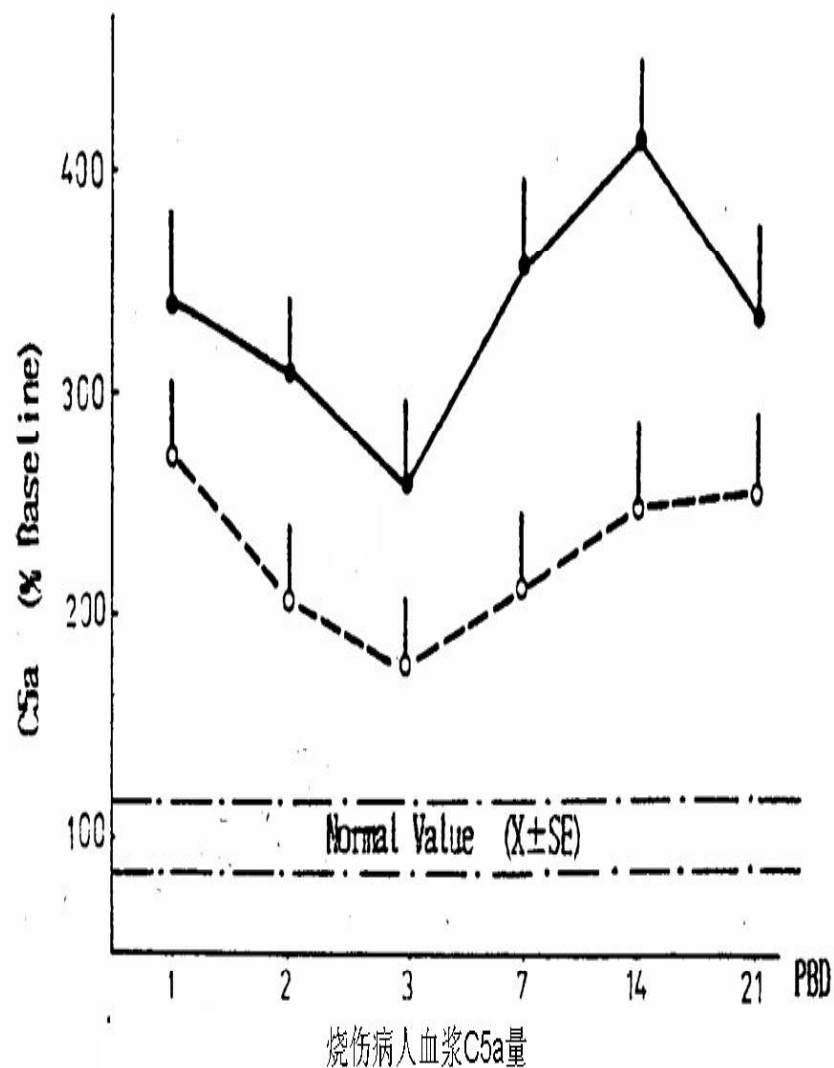
补体裂解 (旁路途径)



释放大量C5a

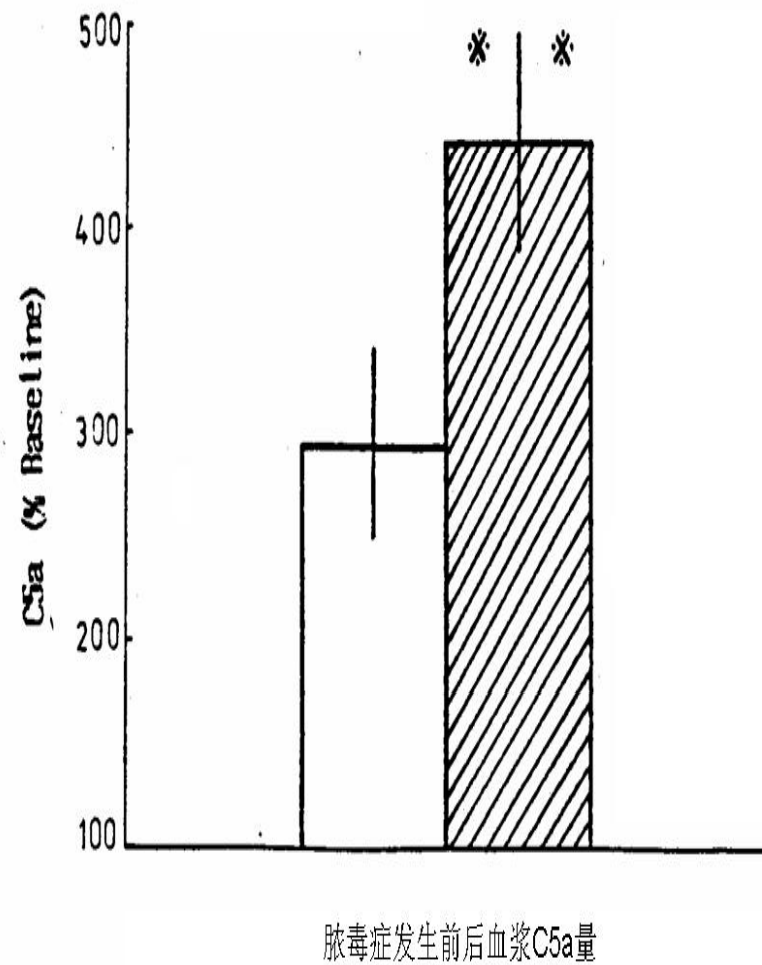


中性白细胞功能↓
感染易感性↑



●—● MODS病人

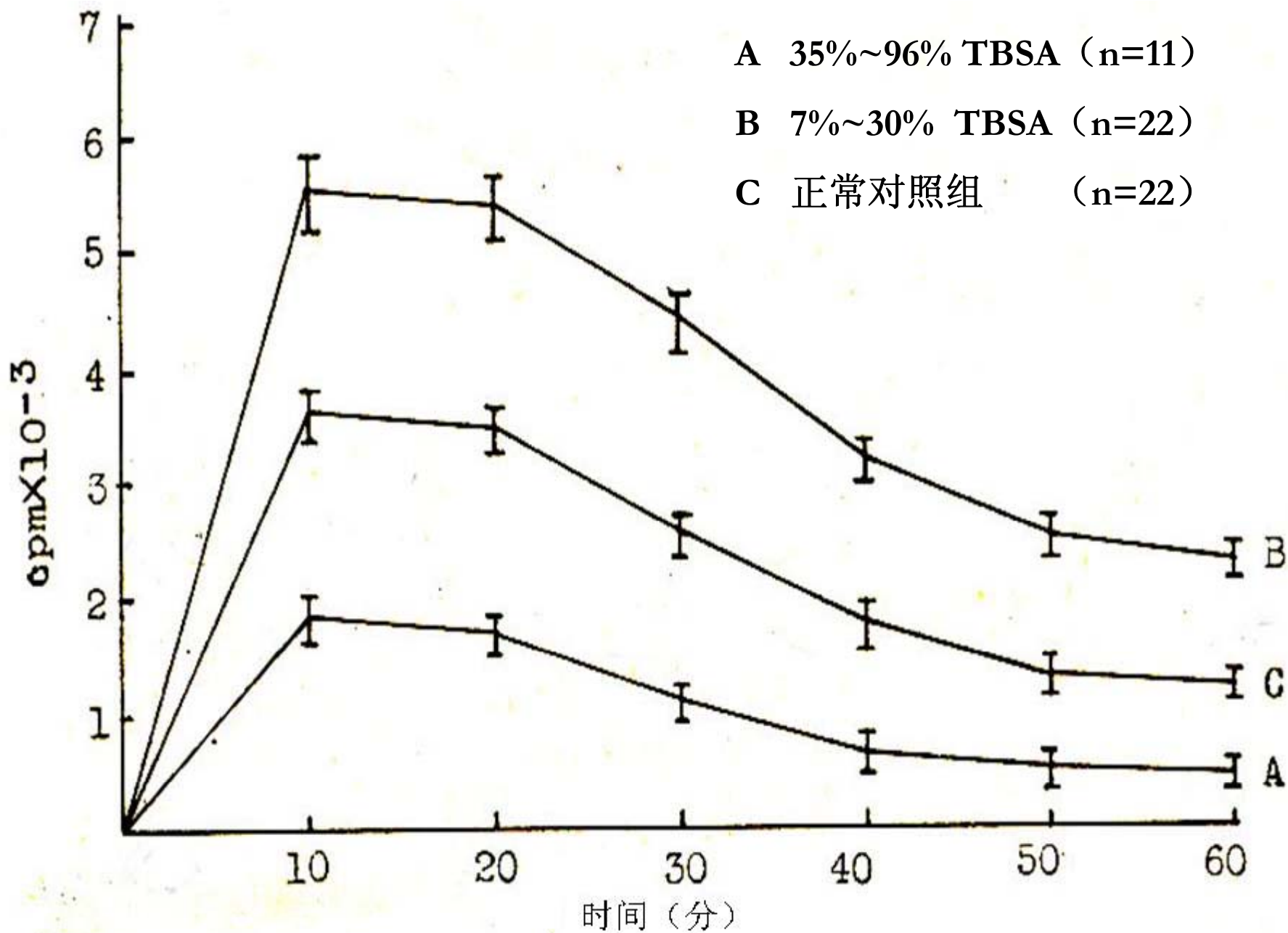
○-○ 无MODS病人



(□) 脓毒症前

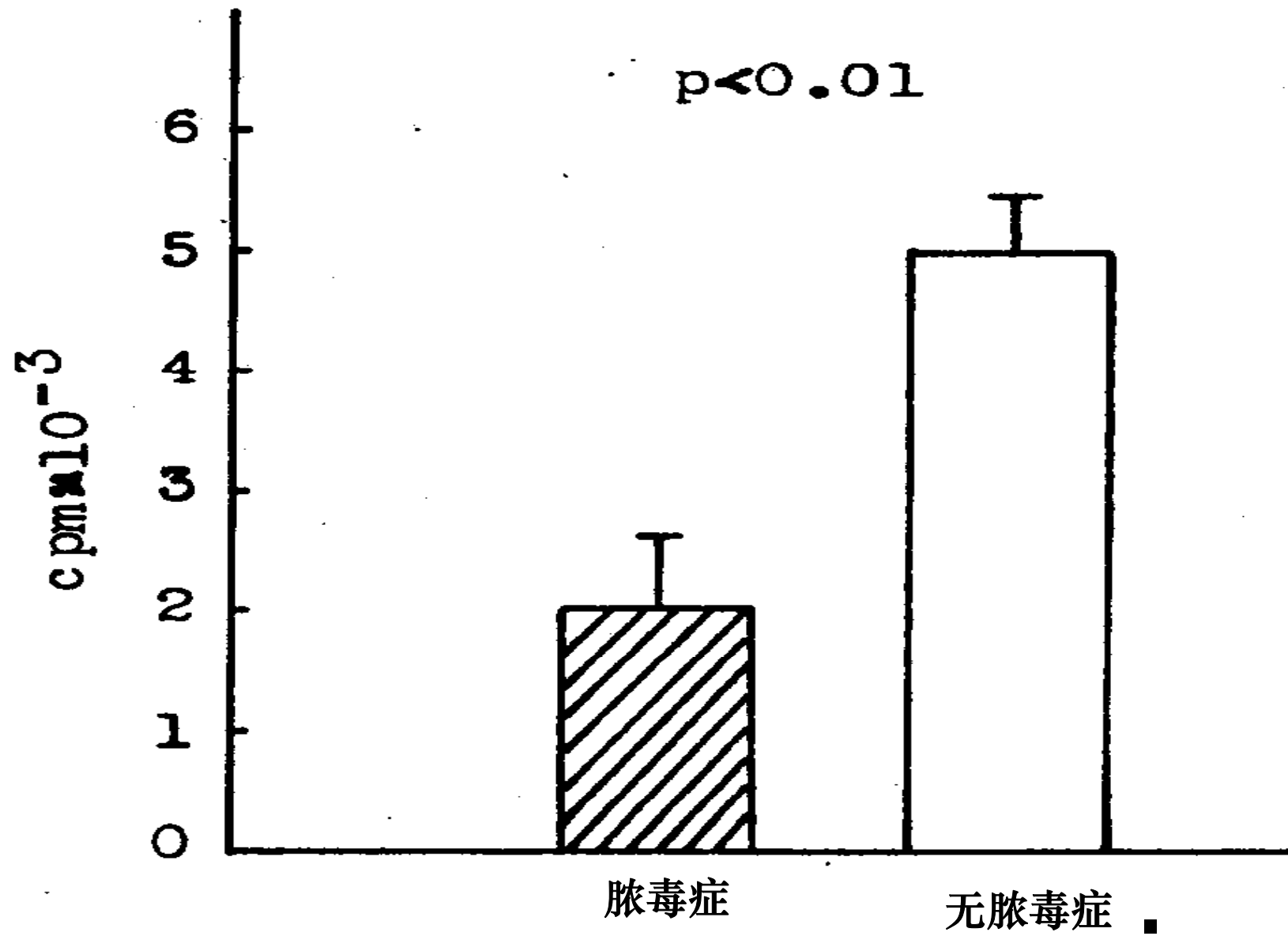
(▨) 脓毒症

** P<0.01.

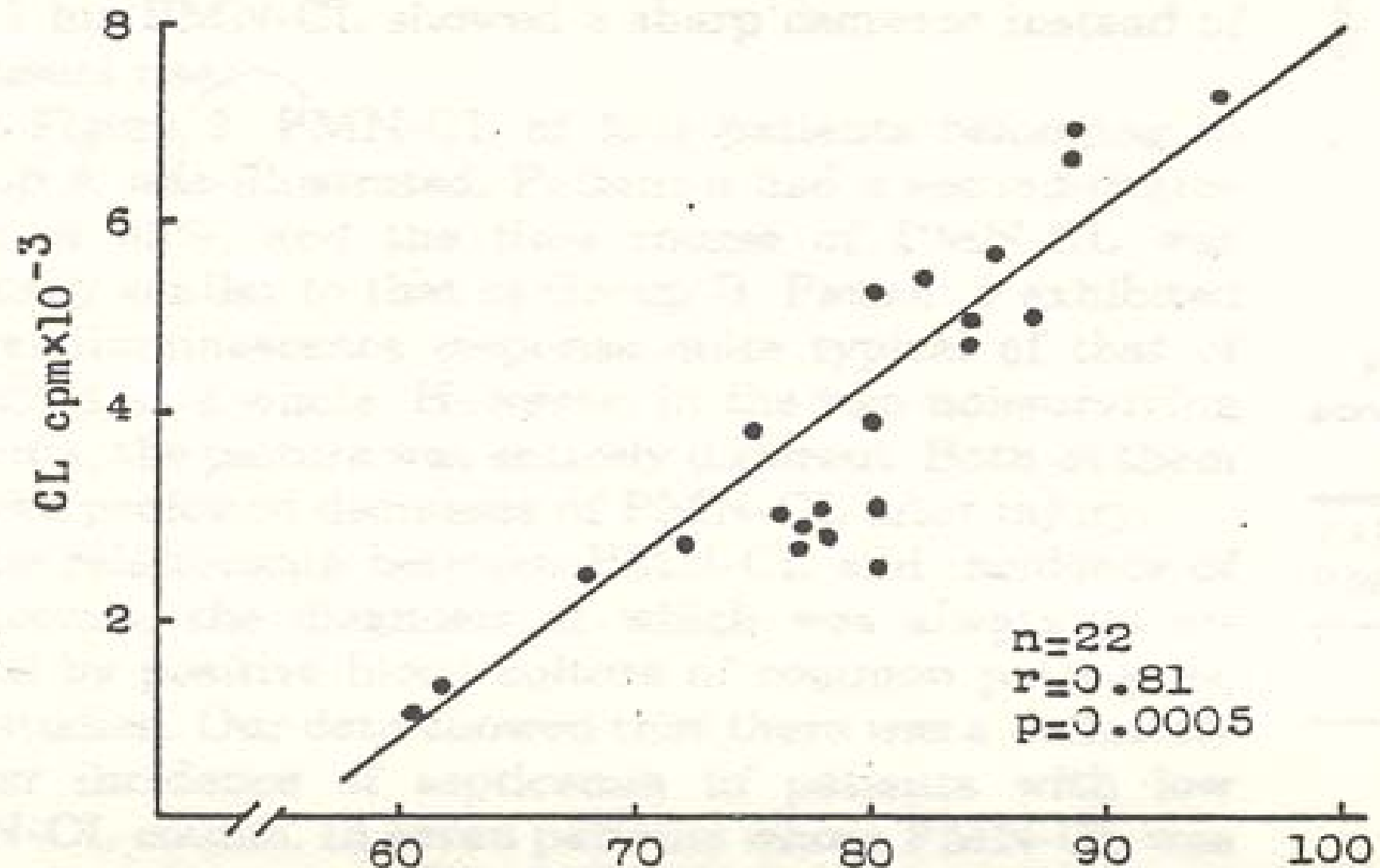


烧伤病与正常人PMN化学发光

($\bar{X} \pm SE$).

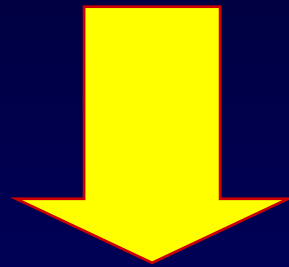


发生和不发生脓毒症病人PMN化学发光强度比较



中性白细胞化学发光强度与杀菌指数的相关曲线

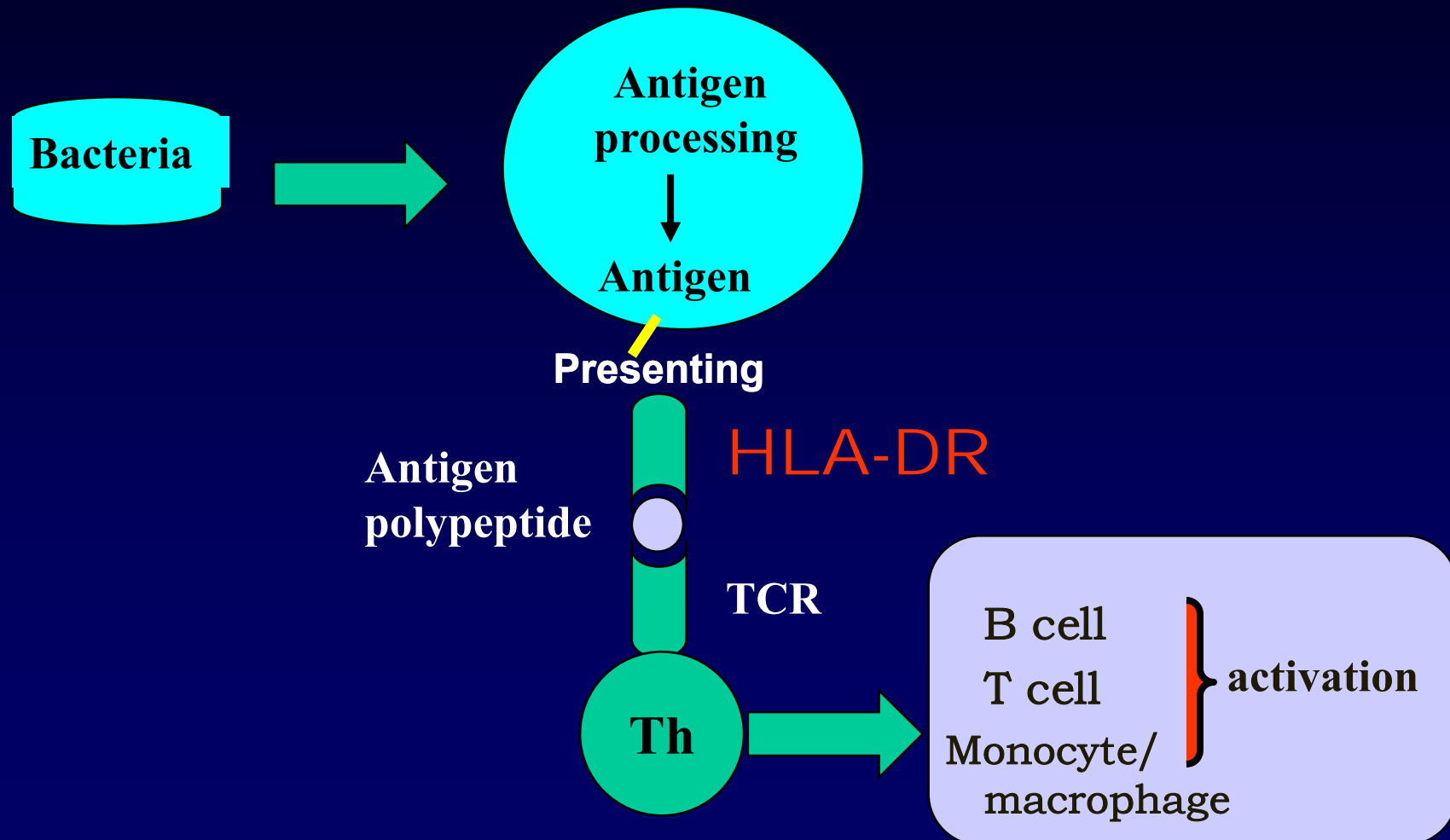
Reduction of bactericidal
function of neutrophils



Increase in susceptibility to
bacterial infection

HLA-DR

in antigen presenting process



Deep burn injury

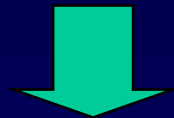


Loss of large number of
dendritic cells

Both from skin and spleen

*Dendritic cells in
skin (Langerhan 's
cells)*

460-1000/mm³

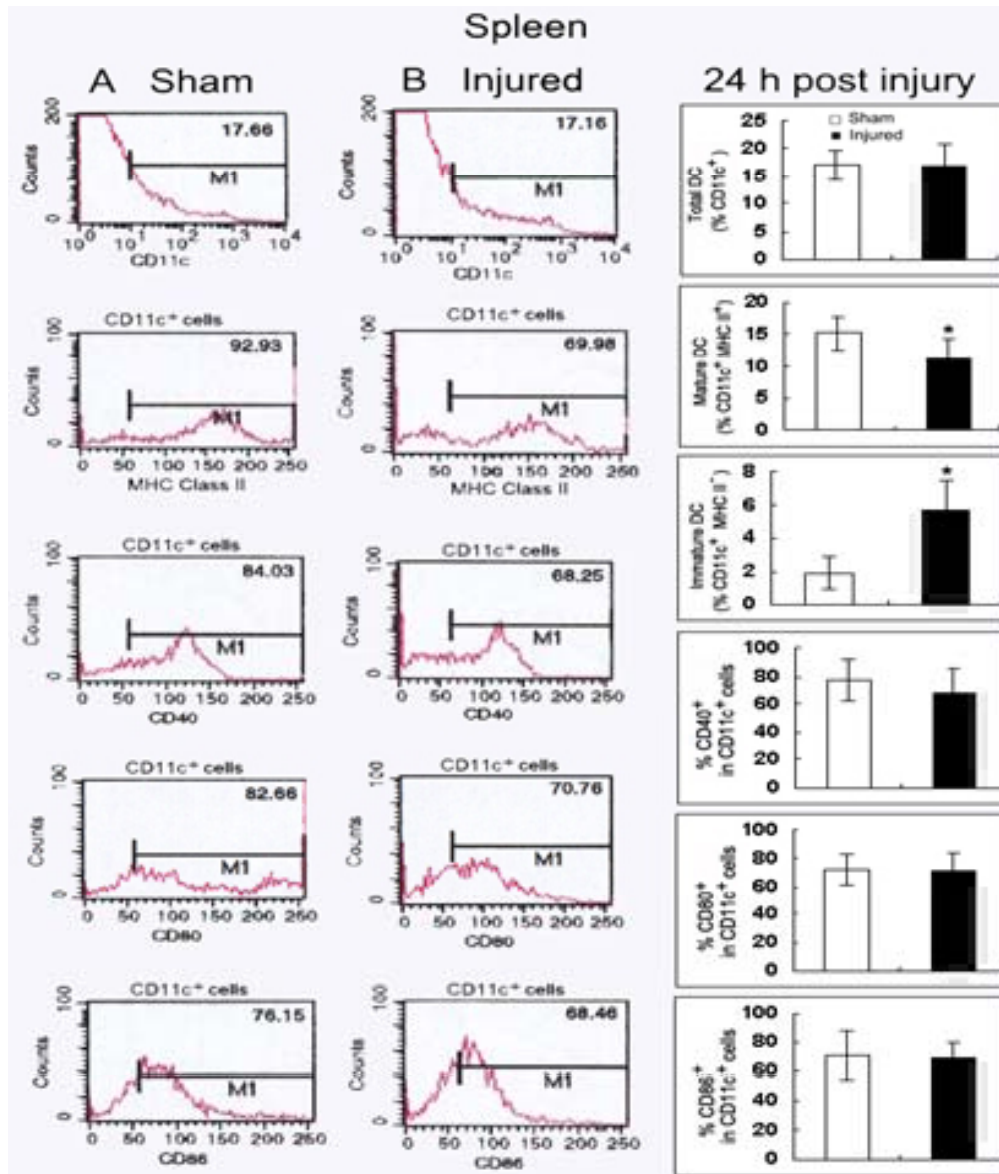


HLA-DR ↓

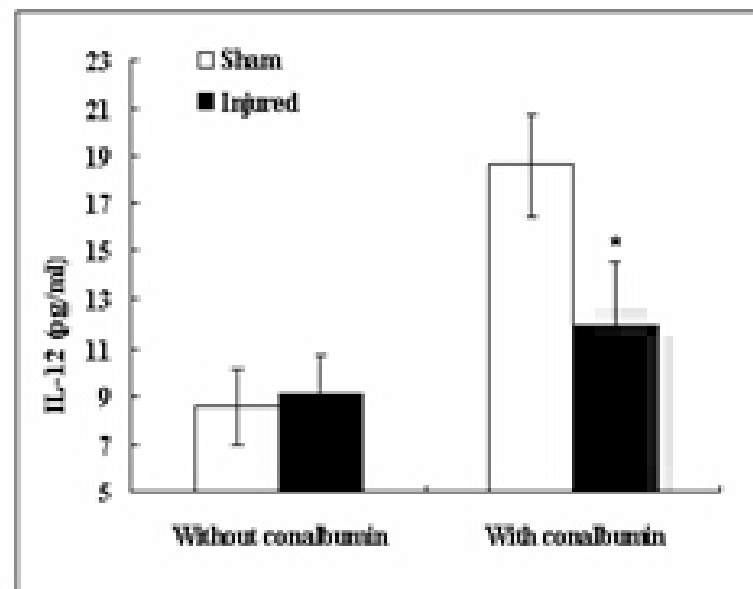
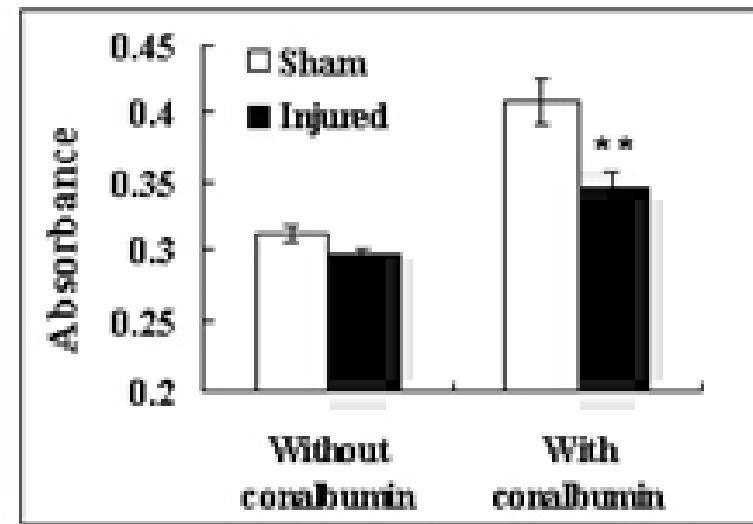


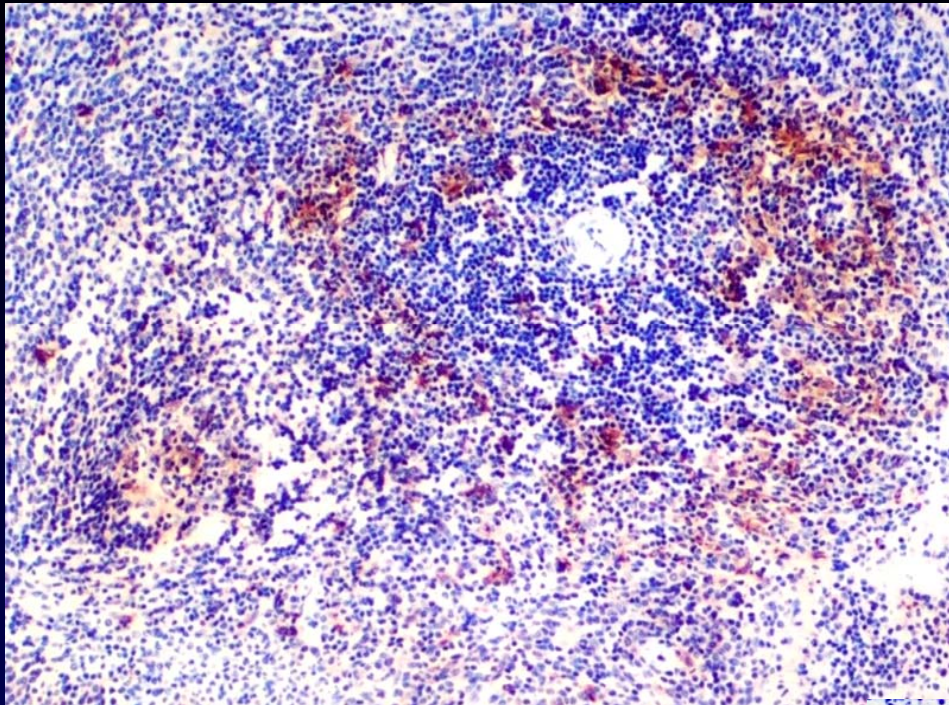
Antigen presenting function ↓

创伤对脾DC表型及其共刺激分子的影响



创伤对脾DC抗原呈递功能影响



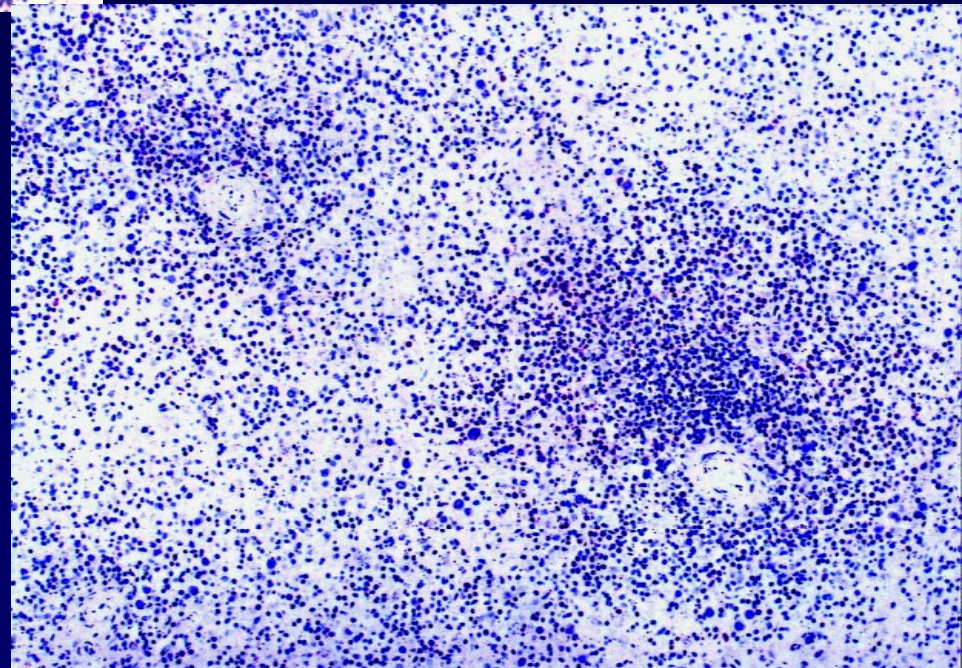


Normal spleen

(HLA-DR marked $\times 100$)

**Intestinal obstruction, postoperative
pulmonary infection with sepsis and
MODS (Female, 36 yrs)**

(HLA-DR marked $\times 100$)



免疫麻痹(immunoparalysis)诊断标准

- ① HLA-DR表达明显减少 (<30%);
- ② 抗原提呈能力下降;
- ③ 产生促炎细胞因子的能力明显下降 (全血受500 pg/ml内毒素刺激后TNF- α 产生 <300 pg/ml)。

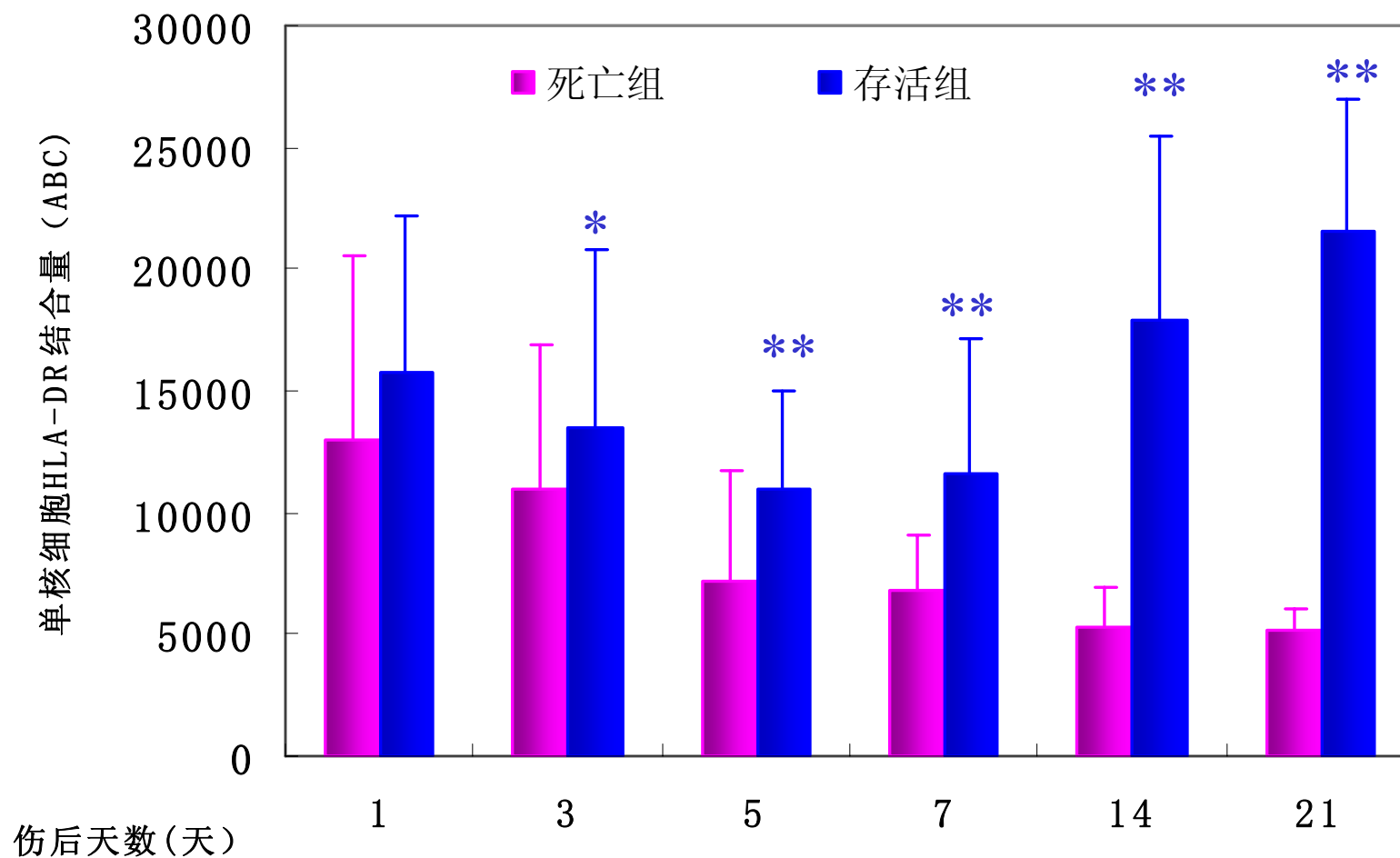
常规工作中主要障碍是流式细胞仪应用及细胞因子检测的标准化程度较差。不同实验室有自己不同的标准，因此不同实验室得出的结果就难以进行比较。

HLA-DR定量表达水平与烧伤面积的关系

| 组别 | 例数 | 年龄 | 烧伤总面积 | III°烧伤面积 | HLA-DR结合量 (AB/C) |
|-----|----|-------------|------------|-------------|---------------------|
| I | 35 | 35.2 ± 10.0 | 40.2 ± 6.5 | 17.6 ± 10.0 | 20409.8 ± 11020.7 |
| II | 36 | 33.7 ± 15.1 | 61.8 ± 8.7 | 31.0 ± 16.7 | 13369.2 ± 9323.3* |
| III | 36 | 31.0 ± 9.9 | 90.2 ± 6.1 | 66.3 ± 17.1 | 9039.3 ± 3901.2**## |

注：分别与 I 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 II 组比较, ## $P < 0.01$

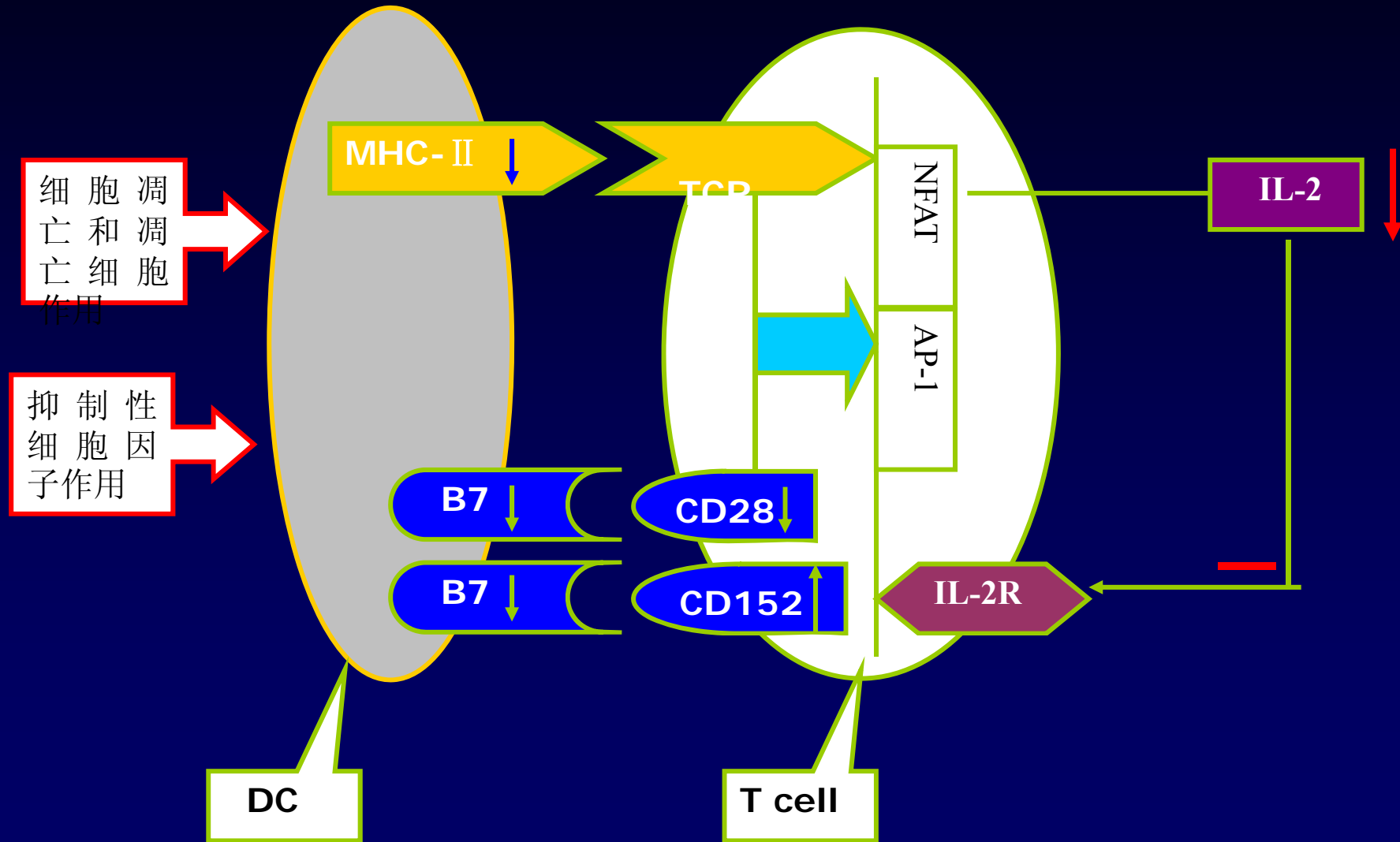
烧伤脓毒症患者预后与单核细胞HLA-DR结合量的关系



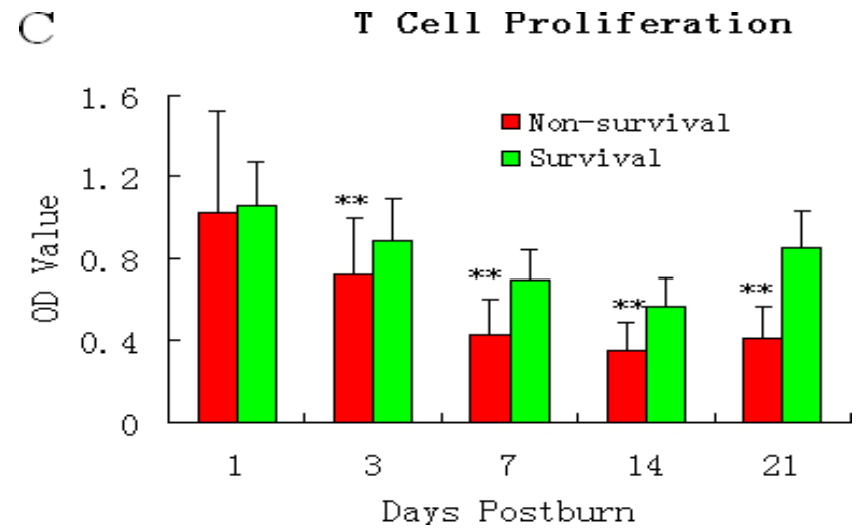
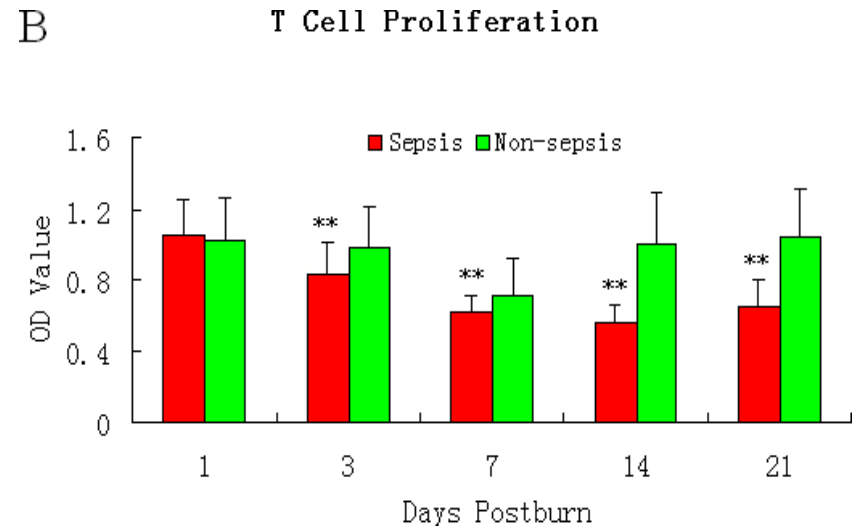
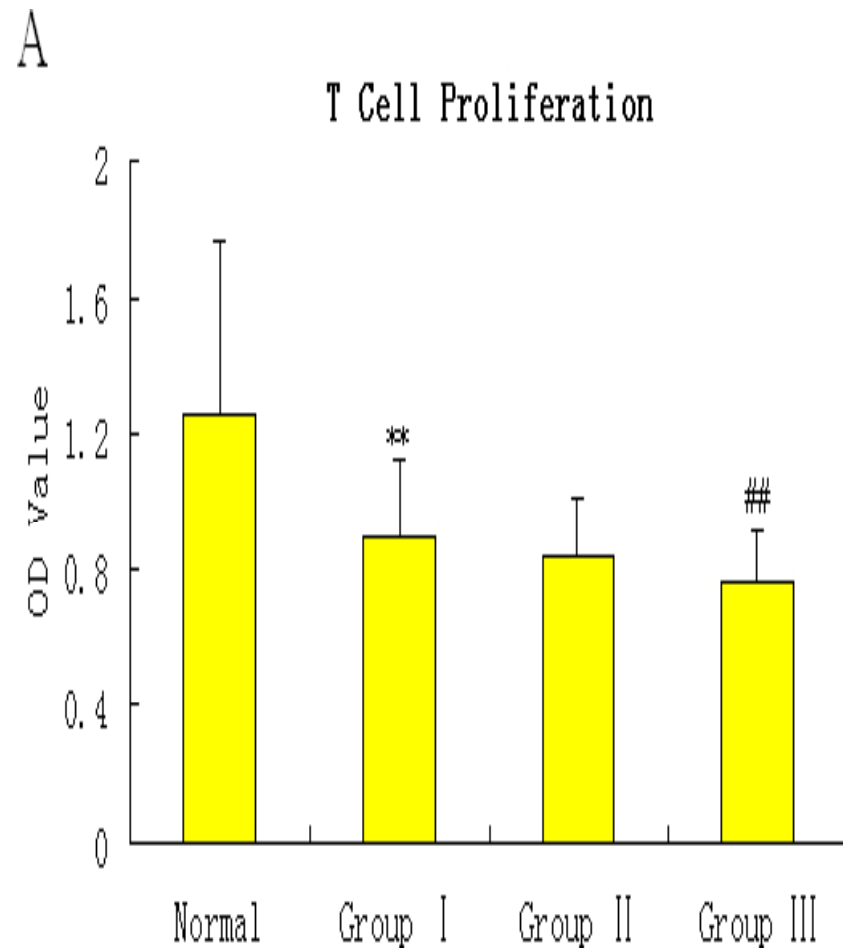
CD14+单核细胞HLA-DR表达水平与严重烧伤免疫功能障碍程度及患者预后的关系

| HLA-DR 表达量 | 免疫功能 障碍程度 | MODS 发生率 | 病死率 (%) |
|---------------|--------------|-------------|------------|
| > 30000 | 正常状态 | | |
| 20000~30000 | 轻度障碍 | 0% | 0 |
| 10000~20000 | 中度障碍 | 25% | 28.6 |
| 5000 ~10000 | 重度障碍 | 70% | 60.0 |
| < 5000 | 免疫麻痹 | 100% | 100.0 |

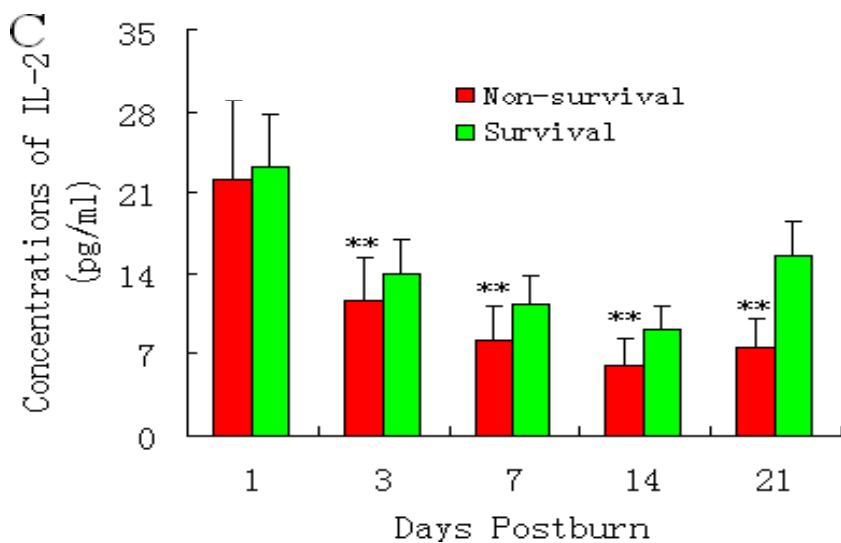
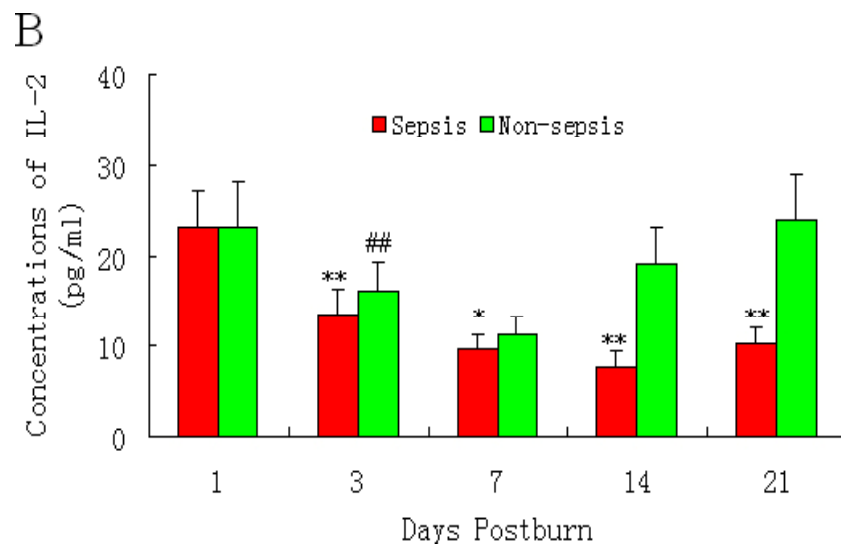
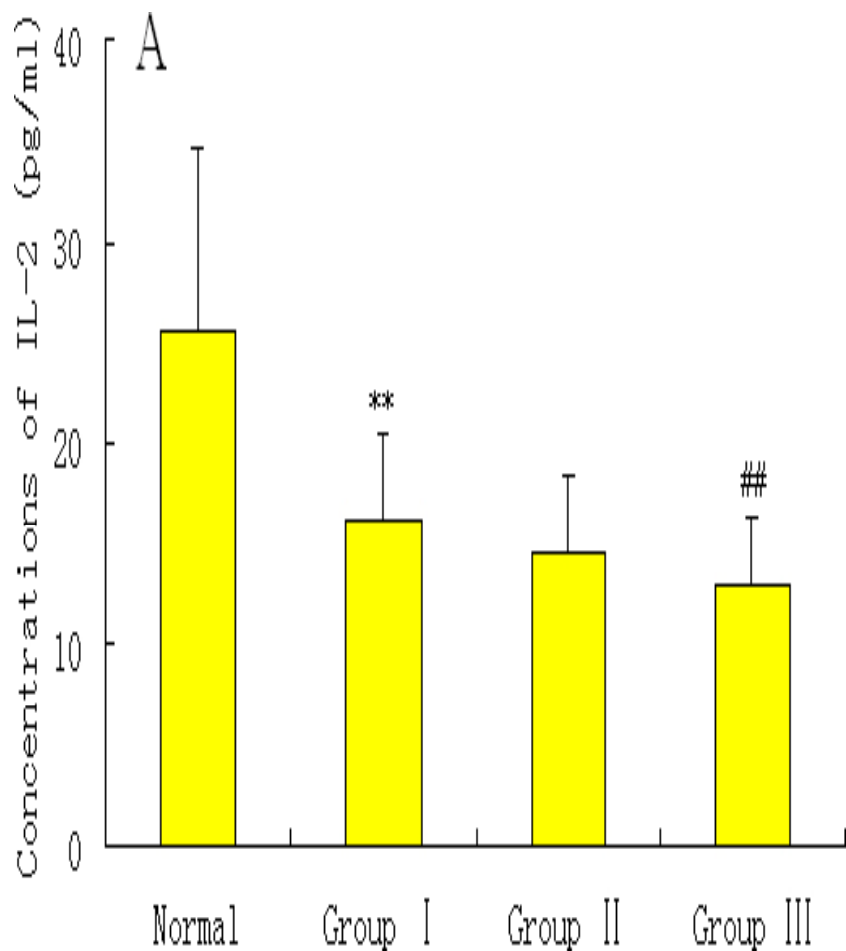
T淋巴细胞的克隆无反应状态



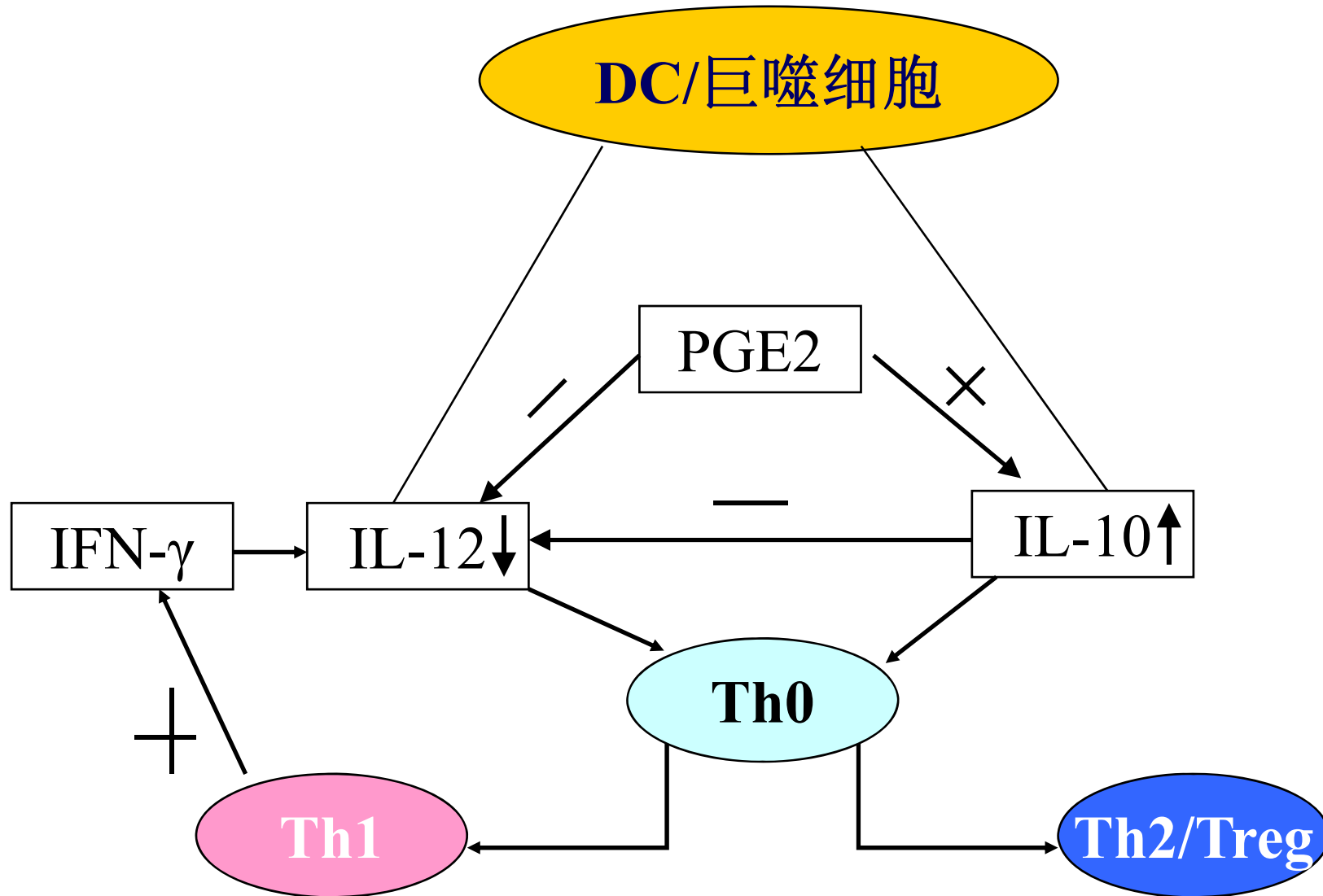
严重烧伤患者T淋巴细胞增殖功能的变化



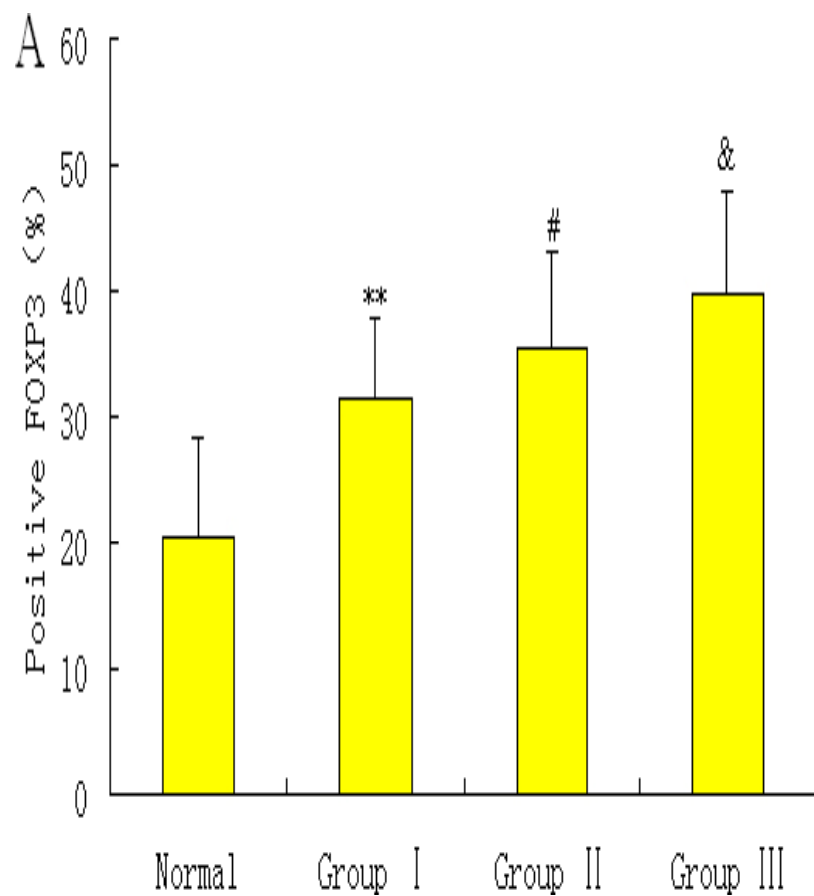
严重烧伤患者T淋巴细胞分泌IL-2水平的变化



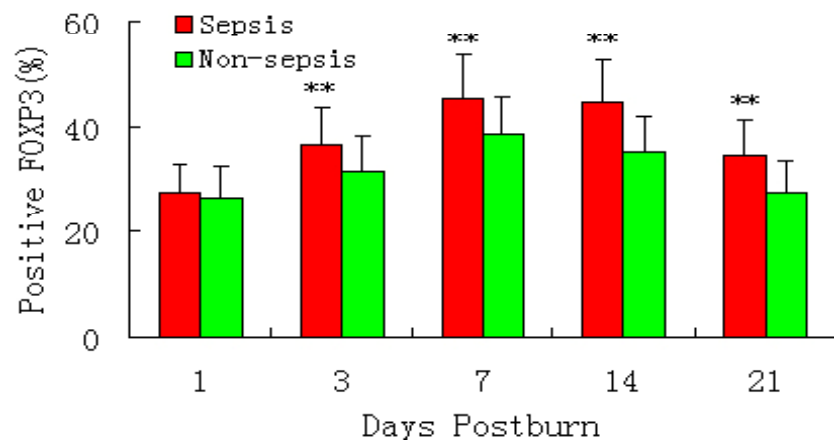
CD4+T淋巴细胞的功能性分化



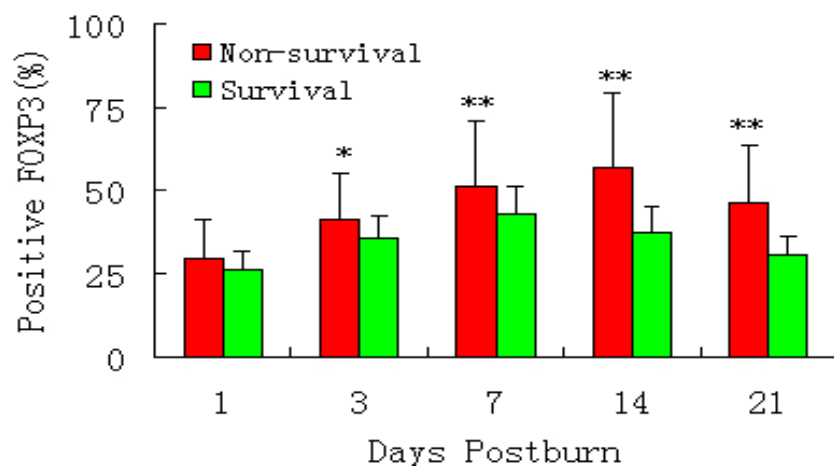
严重烧伤后Treg FOXP3表达的变化



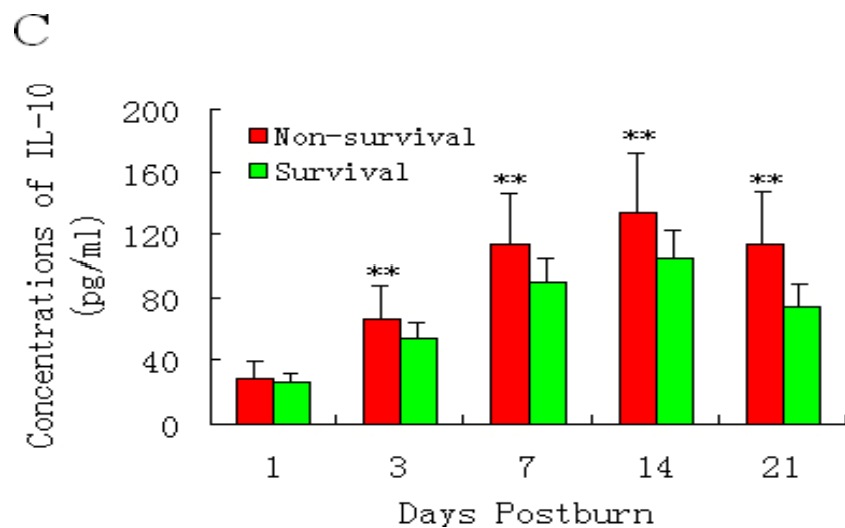
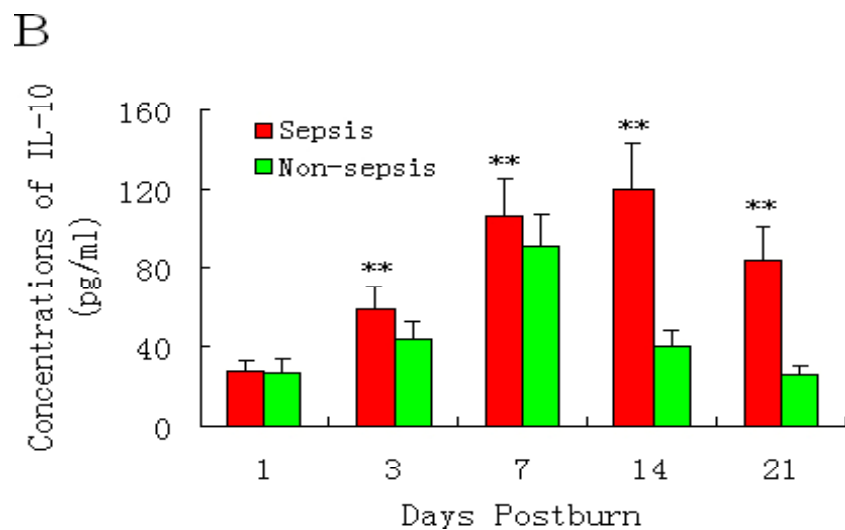
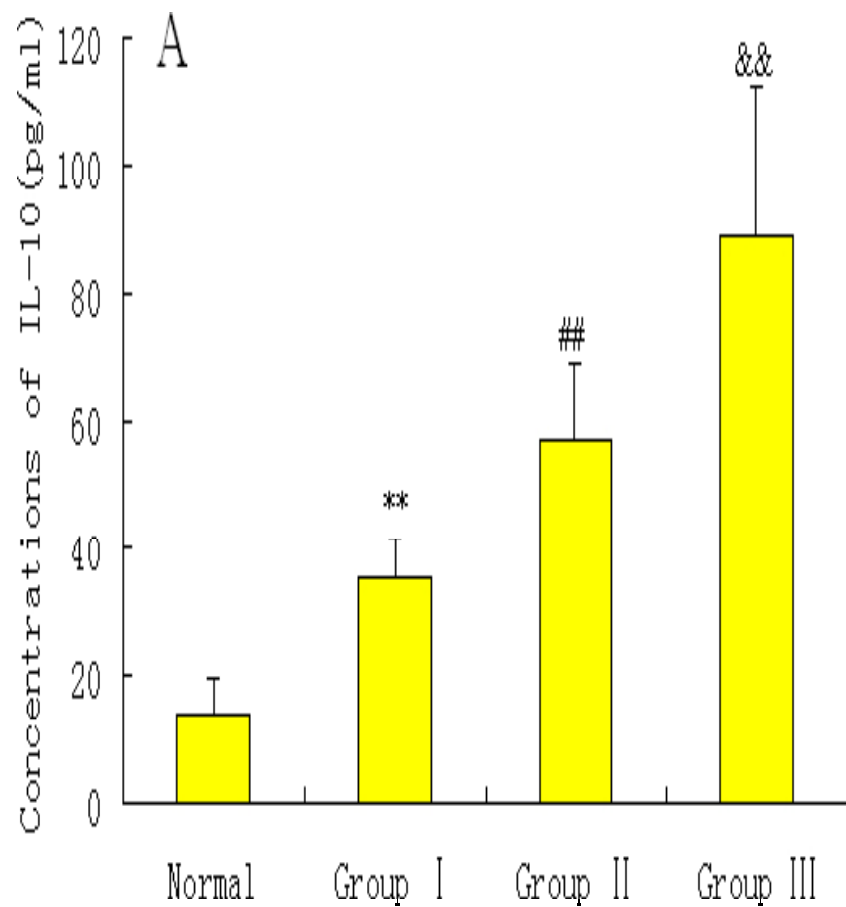
B



C

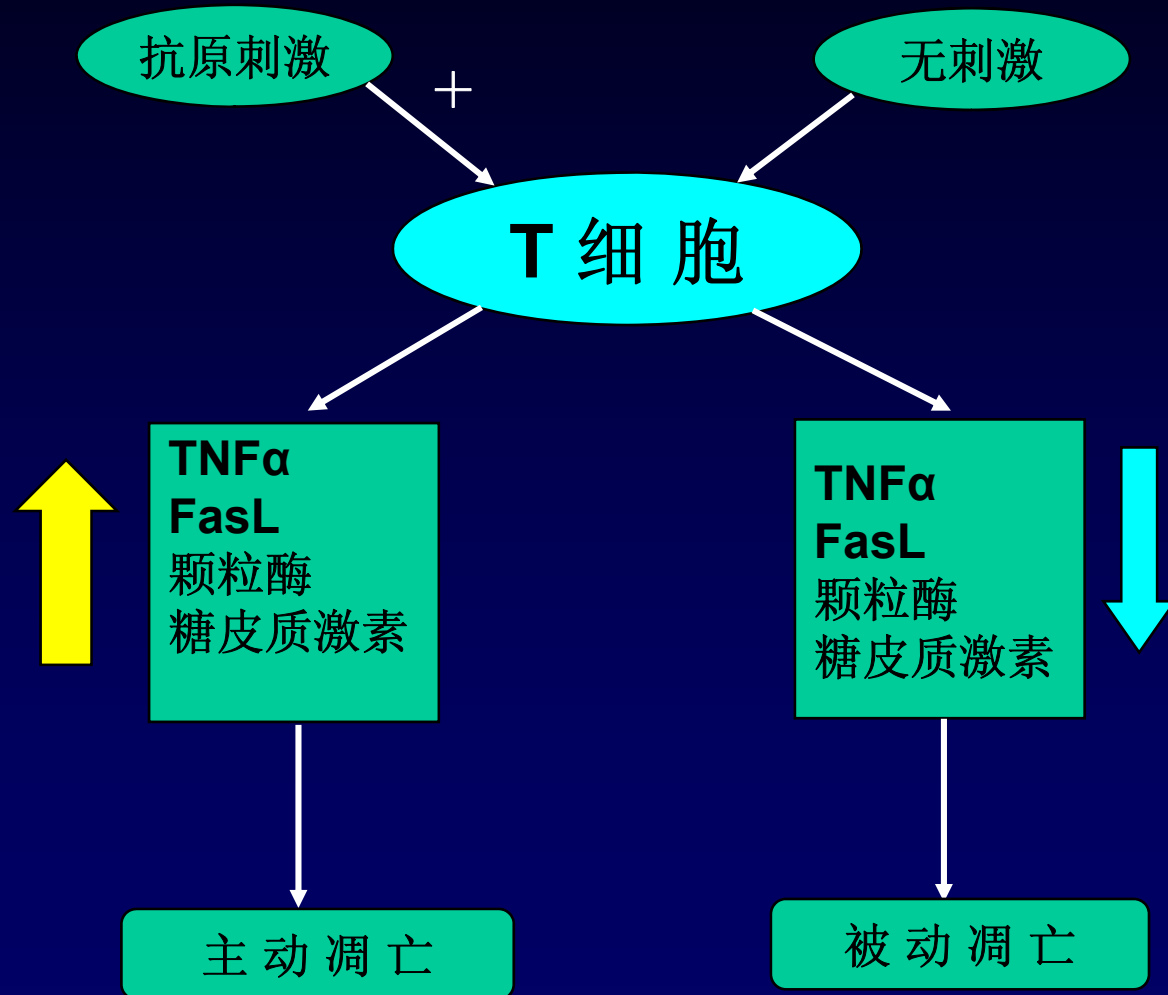


严重烧伤后Treg分泌IL-10水平的变化



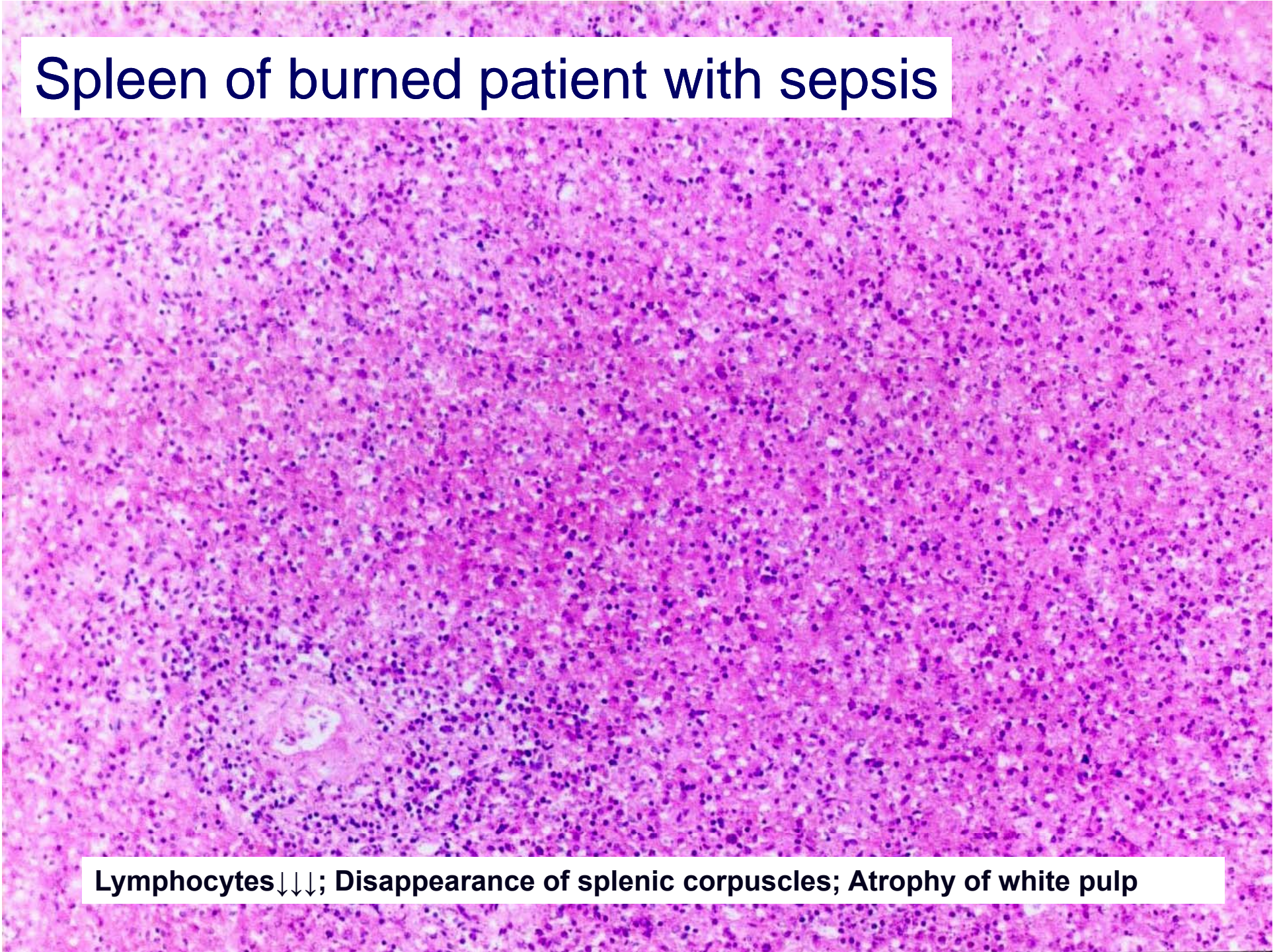
细胞的正常凋亡与加速凋亡

- 细胞凋亡本是细胞死亡的被动和正常生理过程。但脓毒症中，细胞凋亡加速，成为主动的病理过程。已证实，诱导脓毒症细胞凋亡加速的主要物质是促炎细胞因子，如TNF α 、FasL、颗粒酶和糖皮质激素等。



Spleen of burned patient with sepsis

Lymphocytes↓↓↓; Disappearance of splenic corpuscles; Atrophy of white pulp



Spleen of septic rats

Proliferation of macrophages
Lymphocytes decreased
Atrophy of splenic corpuscles
Large number of apoptotic lymphocytes

大鼠MODS胸腺

巨噬细胞吞噬凋亡小体



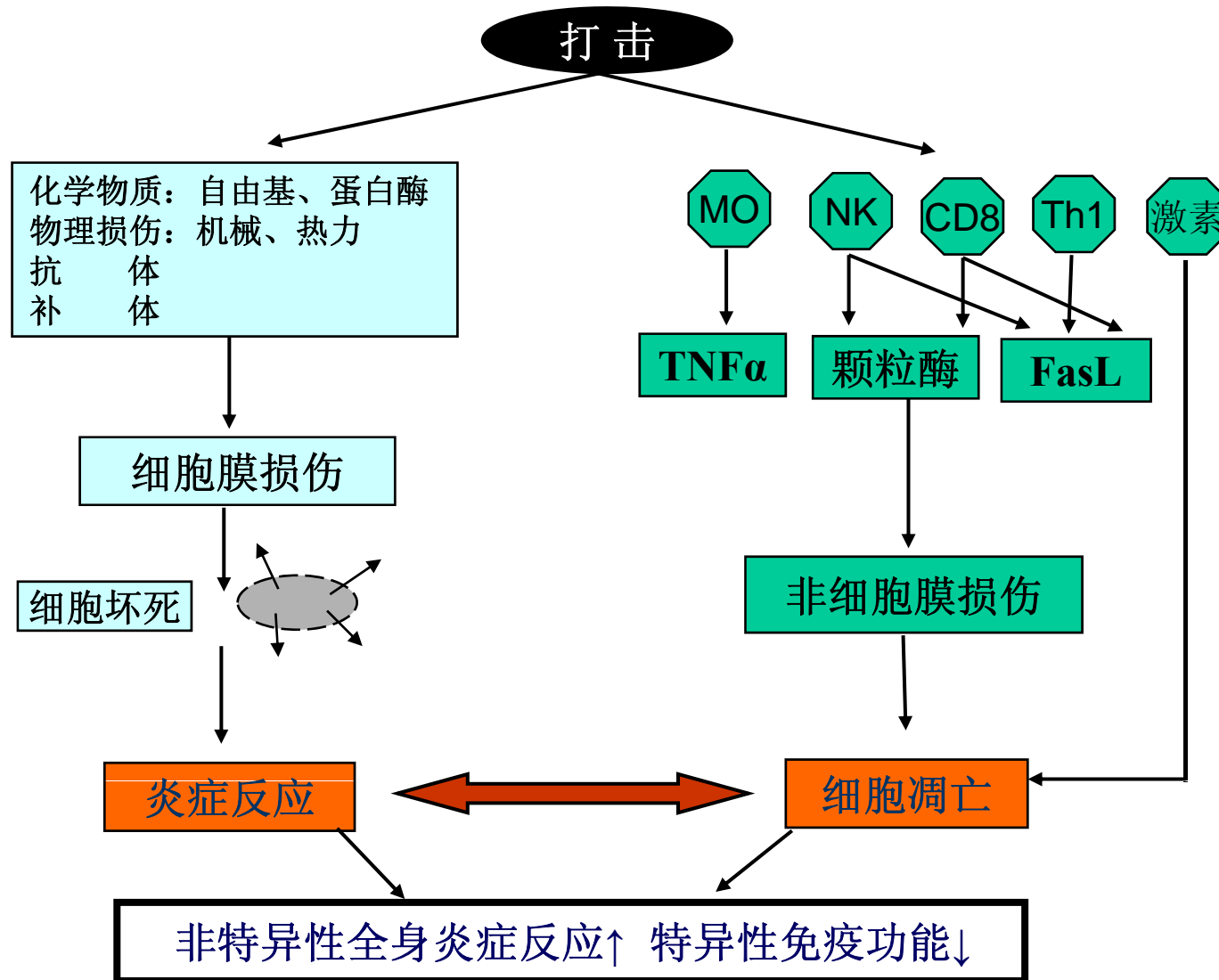
脓毒症时间愈长, T细胞和B细胞的缺失愈加明显, 大部分患者死于长期的低免疫状态期。

----- 《新英格兰医学杂志》

The New England Journal of Medicine

2003; 348: 138-150.

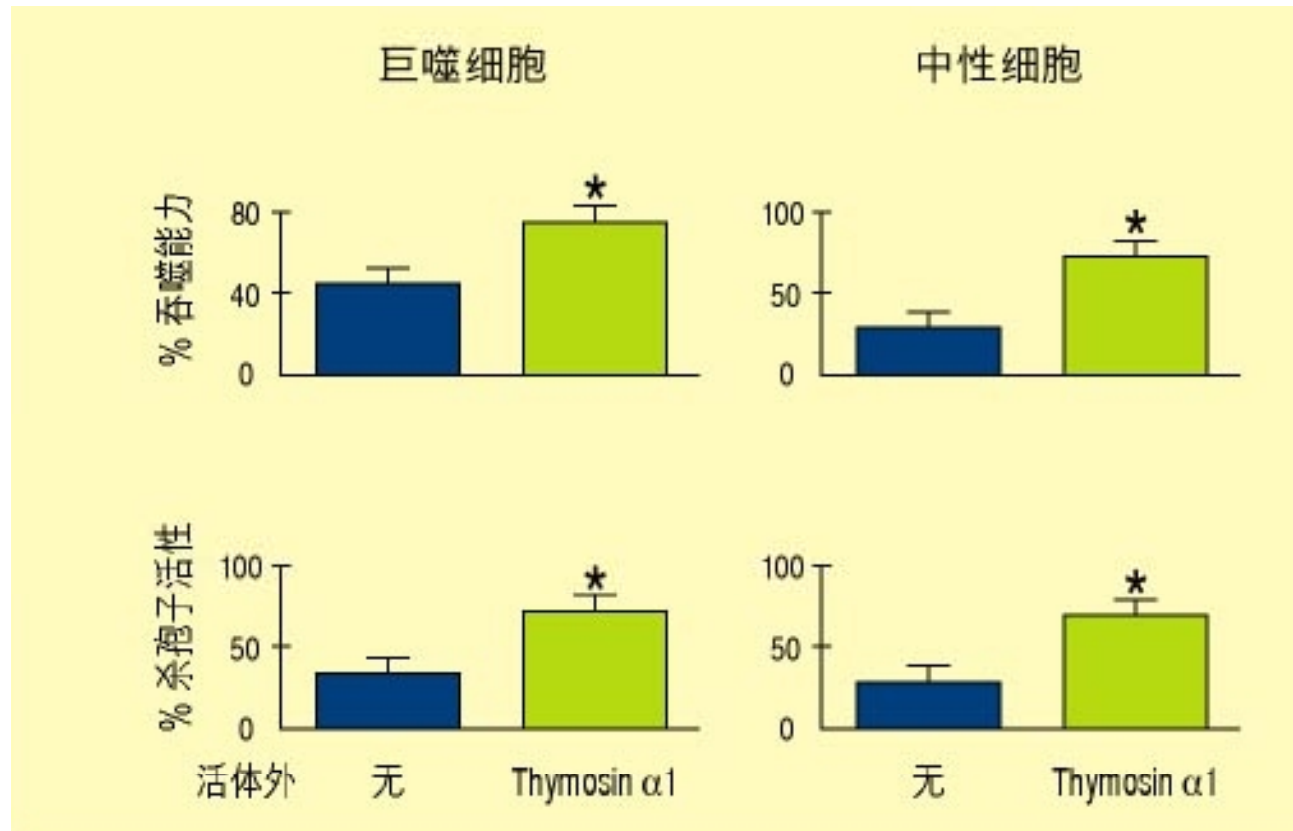
脓毒症炎症免疫反应示意图



目前治疗措施

- ★ 乌司他丁 (Ulinastatin) 抑制炎症反应
- ★ α 胸腺肽提升抗原提呈功能

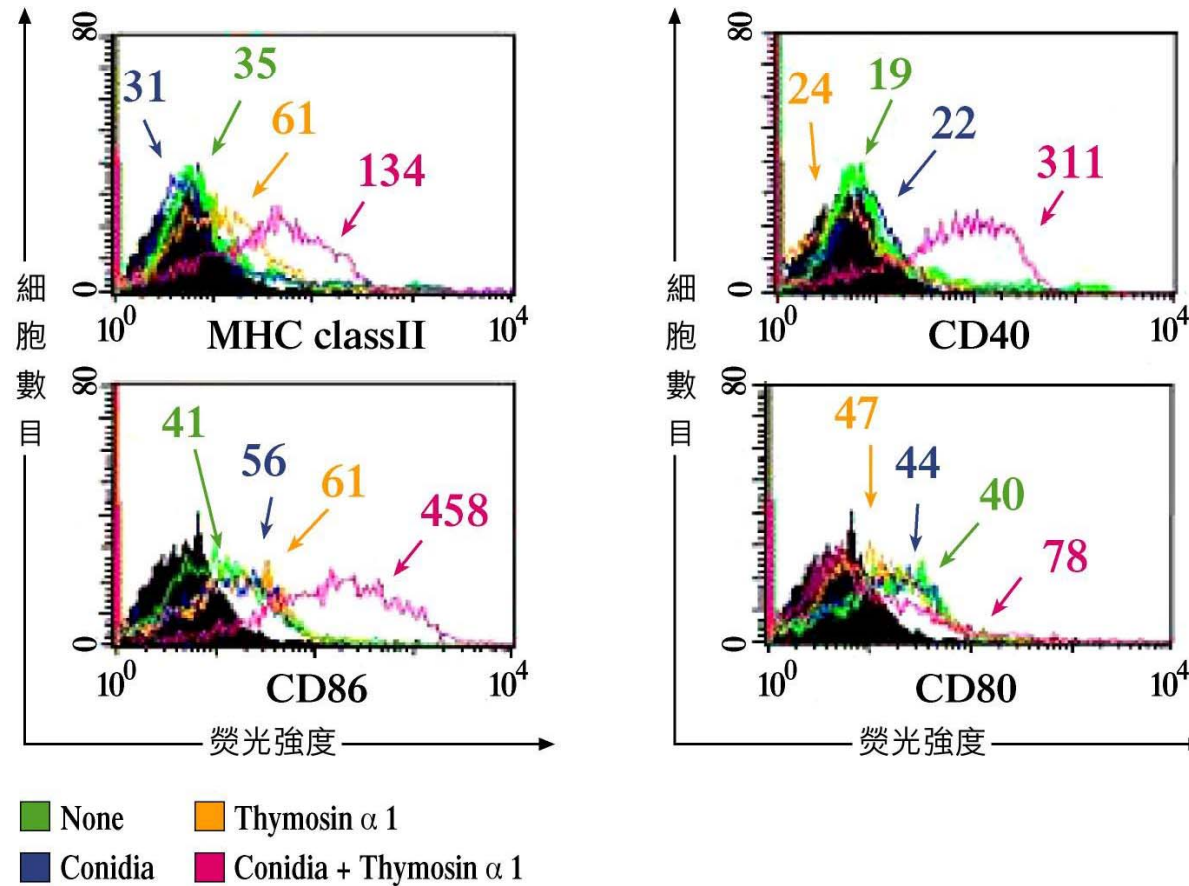
增加巨噬细胞及中性粒细胞吞噬及杀菌能力



取自无感染的小鼠支气管肺泡巨噬细胞和外周中性粒细胞, 预先用 $T\alpha 1$ 培养, 后暴露于孢子, 测定吞噬能力和杀孢子能力

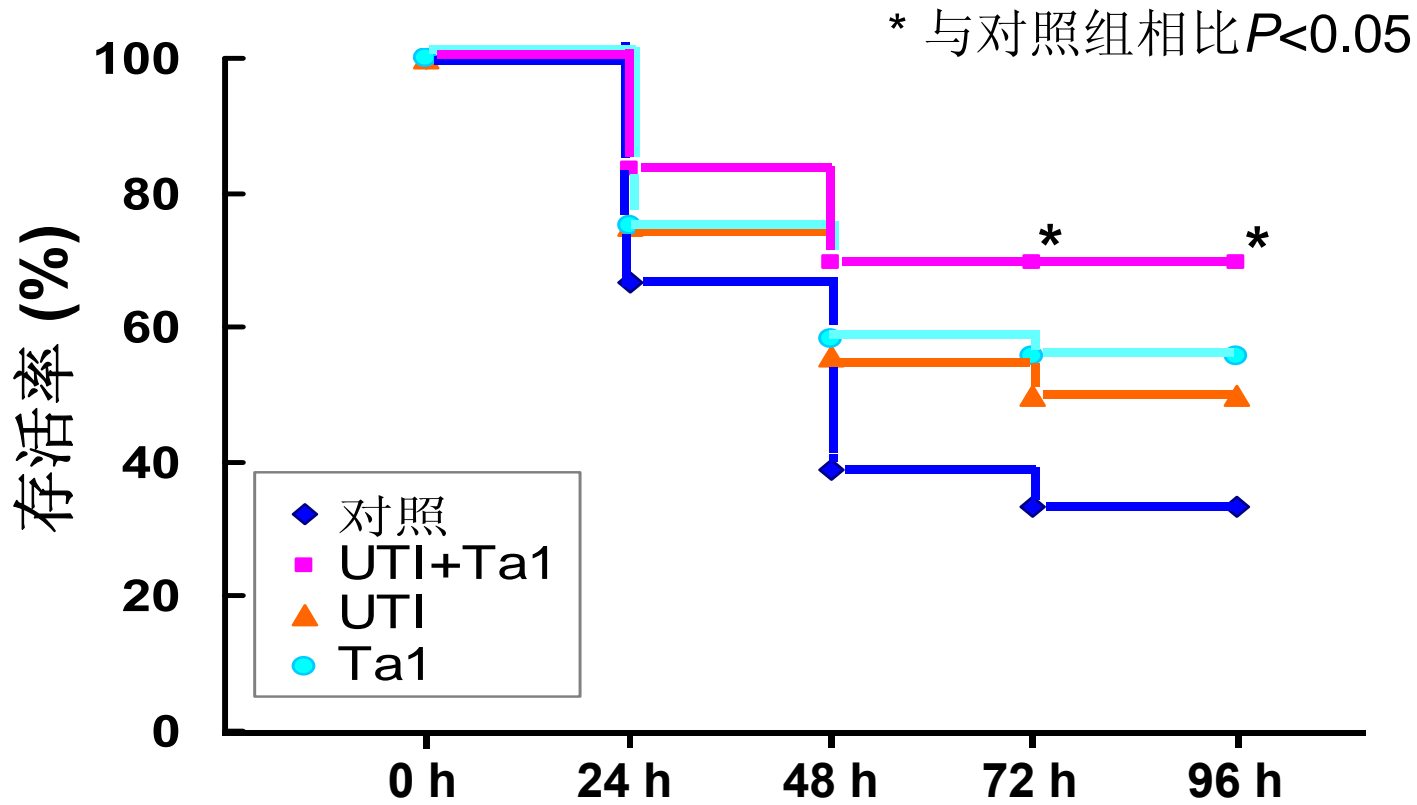
* *Thymosin and dendritic cells in Aspergilosis. Blood, 2004, 103(11): 4237*

激活树突状细胞多种抗原蛋白的表达



用FACS法測定其它輔助刺激分子的表達。圖中看到 DC 細胞 MHC II 級抗原、CD86、CD40 及CD80等分子的表達強度增加。

乌司他丁联合 α 胸腺肽对脓毒症动物存活率的影响

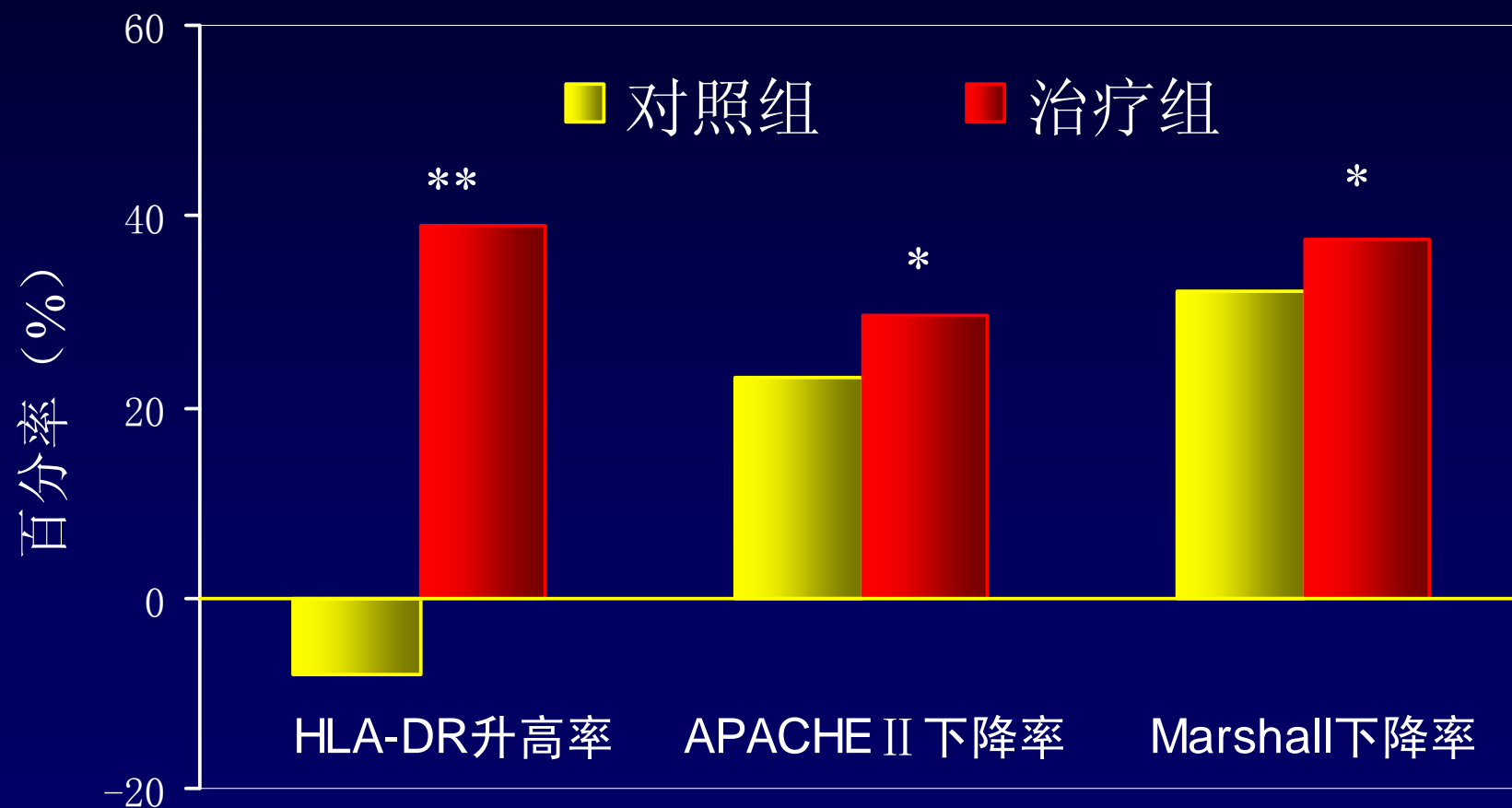


病例入组一般情况及治疗特殊事件比较

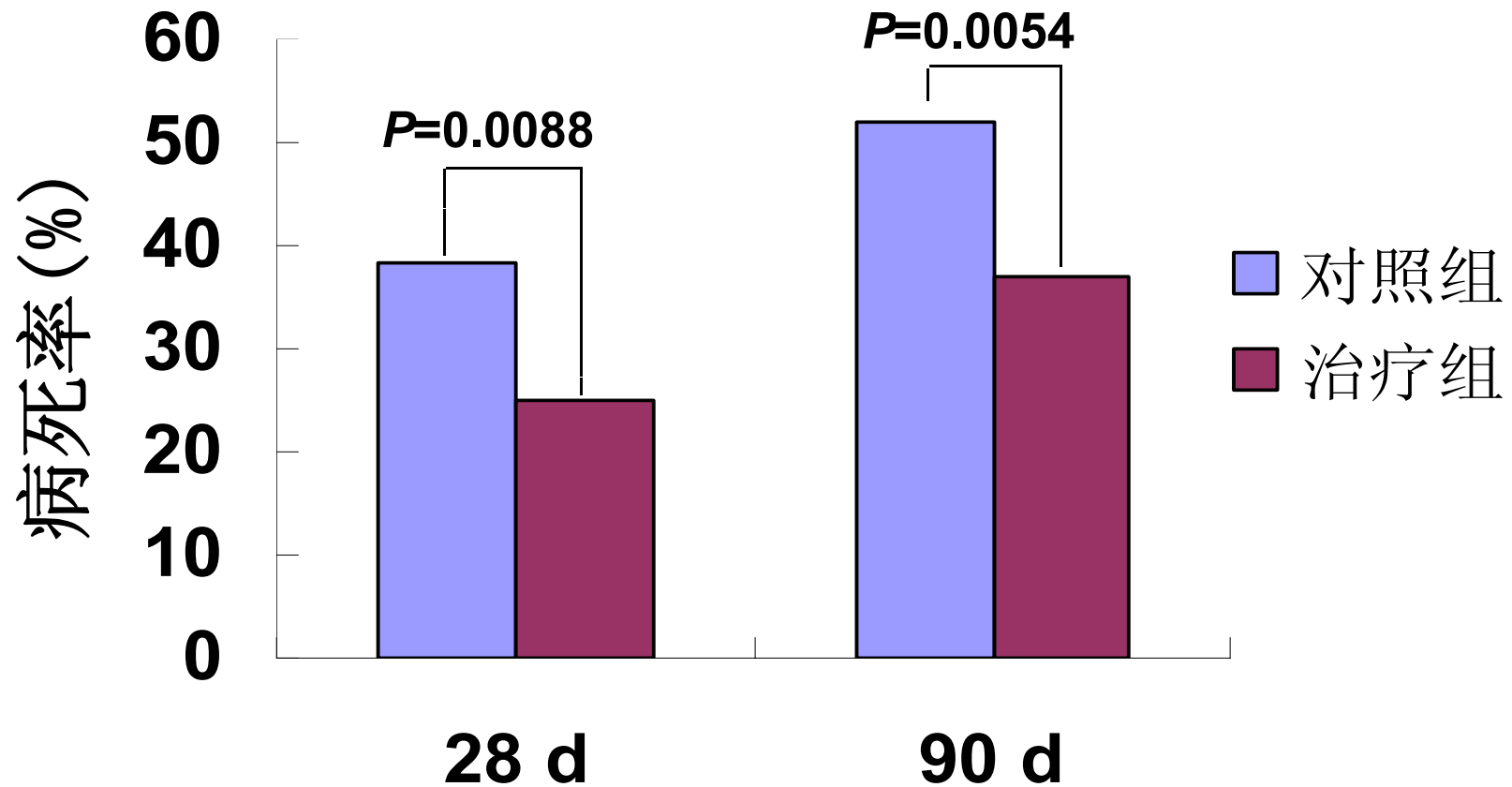
(全国21家三级甲等医院多中心临床试验)

| | 对照组 | 治疗组 | <i>P</i> 值 |
|------------|-------------|-------------|------------|
| 年 龄 | 55.4+/-19.4 | 56.6+/-16.6 | 0.565 |
| 性别比例 | 77.9/25.1 | 77.3/22.8 | 0.605 |
| APACHE II | 18.0+/-6.2 | 18.1+/-7.0 | 0.833 |
| Marshall评分 | 7.5+/-3.8 | 7.7+/-3.8 | 0.455 |
| 应用激素(%) | 33.2 | 36.5 | 0.511 |
| 血液滤过(%) | 20.0 | 20.4 | 0.934 |
| 血液透析(%) | 4.0 | 4.2 | 0.929 |

治疗组与对照组主要指标的比较



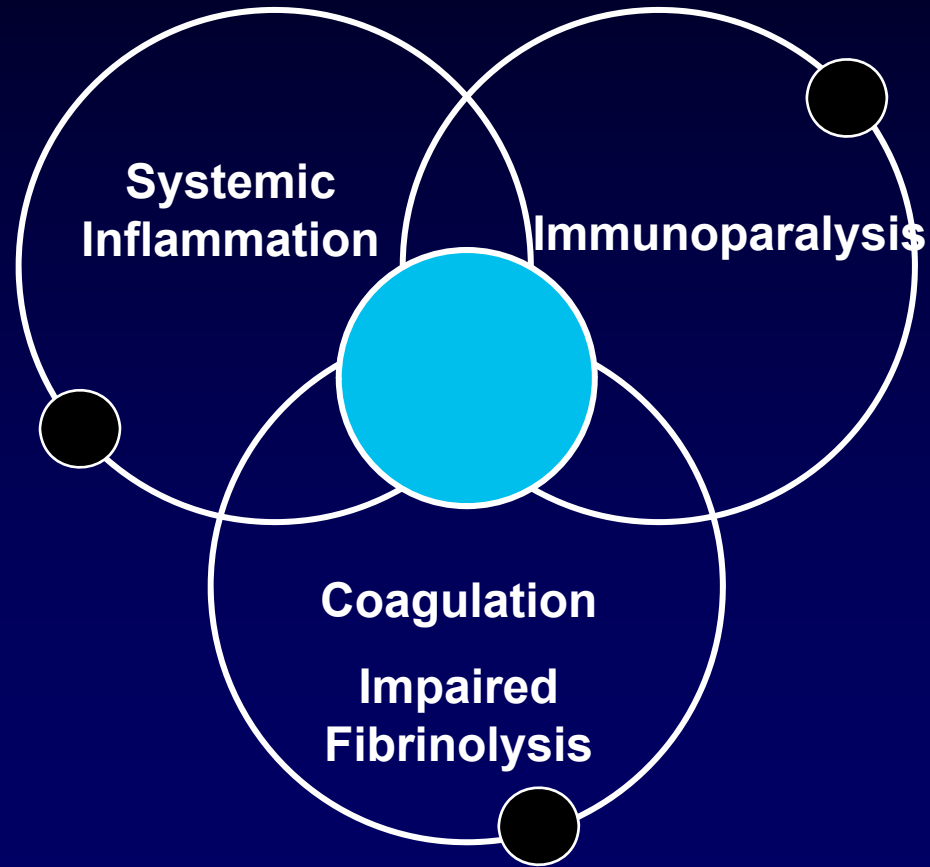
治疗组与对照组脓毒症患者28天及90天病死率的比较



免疫调理治疗新思路

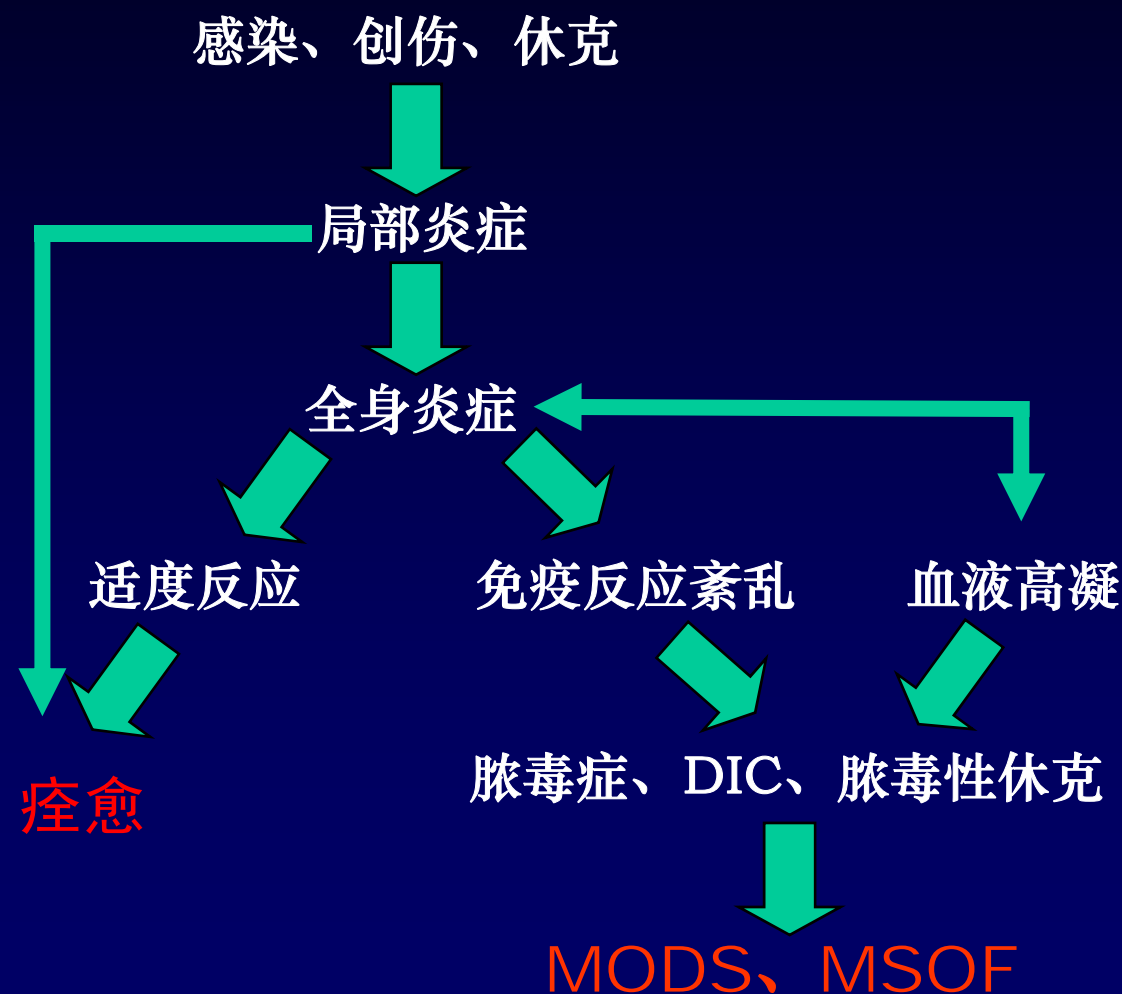
- 采用针对特异性免疫抑制的免疫刺激治疗逆转免疫麻痹，但慎用本身就是炎性介质的药物作为免疫刺激剂；
- 用有效拮抗氧自由基和各种酶的抗炎药物进行抗炎治疗，但慎用糖皮质激素，除非有其他指征；
- 针对细胞因子的单抗既不能覆盖种类繁多的促炎因子，也不能对遭受炎症损伤的机体提供直接保护（既往抗炎治疗“失败”的真正原因）应该放弃。

发病机制复杂且未完全阐明



脓毒症发生和发展机制

- 创伤、感染和休克均可以诱发失控的全身炎症反应
- 失控的全身炎症反应可以造成免疫功能紊乱和血液高凝
- 免疫紊乱导致机体对感染的易感性增加和毒性炎性介质释放增加
- 血液高凝导致 DIC和大量纤维蛋白在血管床沉积，造成器官出血和缺血性损伤
- 上述病情发展将最终导致器官衰竭



谢谢

解放军总医院第一附属医院烧伤研究所