

· 述评 ·

免疫功能紊乱在脓毒症发病中的作用及意义

姚咏明

Host immunosuppression in pathogenesis of sepsis and its clinical implication YAO Yong-ming, Burns Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (formerly 304 th Hospital), Beijing 100037, China

【Abstract】 The excessive inflammatory response accompanied by a dramatic paralysis of cell mediated immunity following severe trauma, shock and burns appears to be responsible for the increased susceptibility to subsequent sepsis. The mechanism of immunodepression is quite complicated, and it is clearly related to the primary injury or disease and also the treatment. Many studies have been done to elucidate essential processes involved in host innate antimicrobial action activities, including activation of the immune response and also its down-regulation, as well as the mechanisms of pharmacologic immune suppression. Presently, it is recognized that abnormal activation of the innate immune response often leads to macrophage deactivation, loss of antigen presentation capacity, T-cell anergy, and the rapid apoptotic loss of lymphoid tissues, which all contribute to the development of sepsis. Data are accumulating to suggest that restoration of immune function is necessary for the recovery from sepsis and subsequent multiple organ dysfunction syndrome (MODS). A better understanding of the activated innate immunity and its physiological response will help to develop new therapeutical approaches aiming at modulating the immune response in conditions such as sepsis.



有关炎症问题的研究在脓毒症领域开展得很早,目前对它的了解无论是在基础理论还是在临床实践方面也都比较深入。传统观念认为,脓毒症是一种失控的持久性炎症反应,是由感染因素诱发的全身炎症反应综合征(SIRS)。基于这种认识,人们应用大量抗炎措施治疗脓毒症,虽然在动物实验中取得了一定的疗效,但在临床应用中并没有收到明显的效果。失败的原因是多方面的,但主要原因是人们对机体复杂的炎症与免疫反应本质认识不足。近年来,脓毒症免疫机制的研究日益受到关注,它牵涉到机体天然免疫系统与获得性免疫系统,其状态与脓毒症的发展和转归息息相关。因此,寻找和选择适宜的监控及治疗靶点,对脓毒症患者免疫系统进行调节并改善预后,已成为现代脓毒症研究的热点和难点问题。

1 机体的天然免疫系统及获得性免疫系统

1.1 天然免疫系统:天然免疫系统又称为固有免疫系统,是哺乳动物最古老的防御系统,是防止病原微生物入侵的第一道防线。然而,关于天然免疫的研究却相对滞后。新近研究显示,天然防御反应在脓毒症的病理生理过程中起着重要作用。天然免疫系统进化相当保守,在植物及简单的非脊椎动物体内都存在,而且其反应方式及过程有某些类似之处。当病原微生物入侵时,天然免疫系统首先感知到,并动员相应的细胞及介质以防止其进一步入侵直至将其清除掉,同时可能导致局部炎症反应,激活特异性免疫反应。

天然免疫反应可有效清除各种病原微生物侵入,如革兰阴性(G^-)菌、革兰阳性(G^+)菌、酵母菌、真菌、病毒及原虫等。病原微生物具有一些共同的抗原,可被天然免疫系统识别,这些抗原主要来自于病原微生物的细胞壁成分、鞭毛、核糖核酸等,它们有一个统一的名称即病原体相关模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)。值得注意的是,机体内也可能存在 PAMPs 的交叉抗原,从而导致自身免疫性

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);国家杰出青年基金资助项目(30125020);首都医学发展科研基金重点项目(2003-2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所

作者简介:姚咏明(1965-),男(汉族),湖北省人,教授,博士生导师,清华大学兼职教授,现任中国微生物学会微生物毒素分会副主任委员,中国中西医结合学会急救医学专业委员会常委等,《中华外科杂志》、《中国危重病急救医学》等 17 种杂志副主编或编委,发表论文 349 篇(SCI 收录 42 篇,ISTP 收录 6 篇),主编及参编专著 21 部,获国际希拉格奖 1 项,国家科技进步二等奖 2 项、三等奖 1 项,省部级科技进步一、二等奖 9 项。

疾病。相对应于外界庞大数量的 PAMPs, 机体发展进化出一套特殊的模式识别受体 (PRRs), 其中 Toll 样受体 (TLRs) 就是一种很典型的 PRRs。TLRs 家族至少包括 12 个成员, 它们都具有相同的亮氨酸重复区域及 Toll-白细胞介素-1 (IL-1) 受体区域。TLRs 家族最早是在果蝇中发现的, 家族中所有成员都具有序列相似的果蝇 Toll 蛋白, 它具有识别外界抗原的功能。TLRs 分布于巨噬细胞、树突状细胞 (dendritic cells, DCs)、吞噬细胞、中性粒细胞及表层上皮细胞的细胞膜上。例如, TLR2/4 可迅速识别 G⁻ 菌释放的内毒素, 在其他辅助蛋白的协同作用下, 充分活化并进一步激活炎症细胞内许多信号通路, 接着引起杀菌/通透性增加蛋白、防御素等抗菌蛋白的大量急性释放。

天然免疫系统在全身和局部组织均可发挥作用。存在于循环中的 PAMPs 可被血中巨噬细胞、DCs、吞噬细胞及中性粒细胞识别, 这些炎症细胞再进一步激活细胞内的炎症信号通路, 释放相应的炎症介质。天然免疫系统还存在于与外界直接接触的表层上皮细胞, 这些系统可根据不同的入侵病原微生物作出相应的反应。天然免疫系统是机体防御系统的重要组成部分, 它可进一步激活特异性免疫反应, 引起炎症、过敏或一些急性期反应, 使机体内组织发生相应改变, 而 ILs、干扰素 (IFNs)、诱生型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶 (COX) 等在其中发挥了重要的作用。

1.2 获得性免疫系统: 获得性免疫系统又称特异性免疫系统。相对于天然免疫反应, 获得性免疫反应只存在于脊椎动物体内, 是天然免疫反应的高级进化形式。该系统组成包括经典的抗体、淋巴细胞和免疫器官, 其主要特点为对外来抗原具有特异性识别、免疫记忆和清除的生物学功能。其中, 免疫器官分为中枢与外周两大部分, 骨髓、腔上囊 (禽类) 及胸腺属于中枢免疫器官, 淋巴结、脾脏及黏膜相关淋巴组织属于外周免疫器官。

淋巴细胞分为 T 细胞、B 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞。① T 细胞来源于骨髓中淋巴样干细胞, 在胸腺微环境中分化、发育成熟, 在分化成熟的不同阶段, 细胞膜上表达出不同的分子, 其中 T 细胞受体 (TCR) 和白细胞表面抗原分子 CD3 是 T 细胞的重要标志。CD3 分子与 TCR 以非共价键结合形成 TCR-CD3 复合物, 其主要功能是把 TCR 与抗原结合后产生的活化信号传递到细胞内, 诱导 T 细胞活化。② B 细胞是获得性免疫系统中抗体产生细胞, 分布于血液、淋巴结、脾脏、扁桃体及其他黏膜组织。B 细胞表面有多种标志, 迄今为止, 属 B 细胞特有或涉及 B 细胞的 CD 分子有 29 种, 它们均有着重要的免疫功能。根据表面标志和功能的不同, 把 B 细胞分为两个亚群: CD5⁺B1 细胞和 CD5⁻B2 细胞。CD5⁺B1 细胞可与多种不同的多糖抗原表位结合, 产生低亲和力的免疫球蛋白 M (IgM) 抗体; CD5⁻B2 细胞对蛋白质抗原发生应答, 产生高亲和力的特异性抗体。B 细胞充分活化后, 不仅能产生特异性抗体, 还能分泌细胞因子和呈递抗原, 发挥重要的免疫效应。③ NK 细胞是一类可以不需要抗原预先致敏就能直接杀伤肿瘤细胞和病毒感染靶细胞的淋巴细胞。NK 细胞通过自然杀伤作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒效应, 释放穿孔素、颗粒酶及细胞因子以发挥生物学功能, 具有抗感染、抗肿瘤和免疫调节的作用。总体上讲, NK 细胞主要参与天然免疫反应, 是机体固有防御系统中的重要细胞。

2 参与免疫应答的主要细胞及其调节效应

2.1 巨噬细胞: 巨噬细胞是单核/巨噬细胞系统的重要组成部分。血循环中的单核细胞进入局部组织并转化为巨噬细胞, 从而发挥吞噬、抗原呈递、限制炎症扩散及清除炎症的生物学功能。巨噬细胞活化是其发挥杀灭病原微生物、清除外来抗原、抑制肿瘤生长等重要功能的前提和必要条件。可使巨噬细胞活化的条件包括 T 细胞来源的细胞因子, 如 IFN- γ 、粒细胞-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等; 还包括病原微生物成分 (如内毒素)、免疫复合物、化学介质及细胞外基质蛋白分子 (如纤溶酶) 等。巨噬细胞充分活化后, 形态增大, 伸出更多的伪足, 细胞膜波动游走性增强, 且分泌大量可造成组织损伤和纤维化的活性介质。巨噬细胞活化后, 主要发挥 3 个方面的生物学功能: ① 抗原呈递: 抗原呈递细胞包括 DCs 和巨噬细胞, 这些细胞可以将抗原呈递给淋巴细胞并促进其活化。巨噬细胞将病原微生物内吞后, 经过消化分解, 将微生物的抗原呈递给分化的效应 T 细胞, 这些效应 T 细胞接着充分激活巨噬细胞, 促使其杀灭病原微生物并释放活性生物介质。巨噬细胞-细胞因子-T 细胞轴在机体的细胞免疫机制中占有十分重要的地位。在激活原始 T 细胞的过程中, 巨噬细胞的作用仅次于 DCs。② 吞噬作用: 巨噬细胞通过吞噬作用清除机体内的坏死物及碎屑, 并防御外来致病菌的侵入。吞噬作用机制与巨噬细胞内的溶酶体和吞噬溶酶体密切相关, 这些胞内小囊的存在既可杀灭病原微生物, 又可保护自身免受伤害。靠近和识别病原菌是吞噬的前提条件, 这依

赖于细胞膜上的受体。巨噬细胞表达多种受体,包括甘露糖受体、清道夫受体、识别调理素的受体、7 个 α 螺旋穿膜结构/G 蛋白耦联受体及 TLRs。这些受体在巨噬细胞识别病原微生物并进行黏附吞噬的过程中起着重要作用。③免疫调理效应:活化的巨噬细胞分泌多种细胞因子,如 IL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IL-10、IL-12、IL-18 等,其中 IL-12 具有调节不同免疫反应的生物学功能,促进活化 T 细胞及 NK 细胞增殖,增强 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞的溶细胞活性,诱导 T 细胞和 NK 细胞合成与释放 IFN- γ ,在辅助性 T 细胞(Th)1 型免疫反应及细胞免疫应答中发挥作用。可以说,IL-12 是连接早期非特异性天然防御反应和后期特异性获得免疫反应的重要桥梁。

2.2 中性粒细胞:中性粒细胞是机体天然免疫系统的重要组成部分,在受到外来病原微生物刺激活化后,可释放炎症因子(TNF- α 、IL-1 及 IL-8 等)、颗粒酶,产生一氧化氮和活性氧等。这些因子有助于清除病原菌感染,但同时组织也有损伤作用。中性粒细胞寿命很短,只有 6~7 h,但生成快。

中性粒细胞在机体抵御早期感染或创伤中占据重要地位。机体在感染或组织损伤时产生并释放炎症介质到受累部位,吸引中性粒细胞向炎症部位游走,分泌抗微生物肽类和蛋白水解酶等,以达到抑制炎症反应的目的。但是,过度的炎症反应可造成中性粒细胞凋亡延迟。持续活化的中性粒细胞黏附于血管内皮细胞上,造成血管内皮细胞间隙增大、内皮完整性被破坏、间质水肿、血管渗漏。大量中性粒细胞在组织中聚集形成微小血栓,引起局部微循环障碍,并持续发挥细胞毒性作用,释放酶、超氧离子等毒性物质,导致组织细胞的破坏;在其衰老、坏死、脱颗粒时释放多种蛋白酶、花生四烯酸代谢产物及氧自由基等,引起细胞膜和细胞器损伤,线粒体和溶酶体膜受损,细胞自溶,致器官功能失调,从而促进了脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)的发展。

2.3 DCs:DCs 广泛分布于除脑以外的全身各器官,数量很少,其前体细胞含量在血循环中占白细胞总数的 1% 以下。DCs 有两条分化成熟途径,第一条为髓样干细胞途径,第二条为淋巴样干细胞途径。通过第一条途径产生朗格汉斯细胞(分布于皮肤等分层的上皮组织中)和间质性 DCs(广泛分布于上皮以外的组织)两个亚群,这两个亚群可合成释放大量的 IL-12。通过第二条途径可产生淋巴样 DCs,它可在感知病毒入侵的情况下迅速(几小时内)分泌大量的 I 型 IFN。

在机体天然免疫系统中,DCs 占有举足轻重的地位,而且 DCs 控制着 T 细胞和 B 细胞的功能,并进一步影响免疫反应和免疫耐受的形成。分布于外周局部组织的 DCs 感知到病原微生物入侵后,进入向心回流的淋巴管并到达 T 细胞聚集的淋巴结组织中,同时活化成熟。活化成熟的 DCs 失去吞噬能力,但具有很强的抗原呈递能力,成为专职性抗原呈递细胞。在淋巴结内,DCs 通过典型或非典型的呈递分子将抗原呈递给 T 细胞。T 细胞受 DCs 激活后,增殖分化为 Th 和效应 T 细胞。另外,DCs 还激活 B 细胞、NK 细胞,成熟 DCs 可通过抗原呈递促进机体产生获得性免疫反应,而不成熟 DCs 则通过呈递缺乏共刺激信号的抗原导致免疫耐受。因此,DCs 既是机体重要的第一道防线,又可通过抗原呈递和分泌细胞因子有效参与获得性免疫应答的发生发展。

2.4 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg):近年来的研究证实,免疫功能紊乱在脓毒症发生发展过程中具有重要作用。宿主的免疫功能状态在很大程度上决定着炎症反应的结局。而 Treg 作为一类具有调节功能的成熟 T 细胞亚群,不仅在机体免疫自稳、移植耐受、肿瘤免疫、过敏反应等方面发挥着重要作用,其在感染免疫中的意义近年来也受到了越来越多的关注。尽管目前研究多集中在慢性感染性疾病,包括细菌、真菌、病毒、寄生虫等方面,但与脓毒症关系方面的报道亦日渐增多。Treg 对 Th 反应的影响自然地赋予了其在感染性疾病中“调定点”的角色。但 Treg 调节效应在哪些水平和环节上乃至何种程度上发挥作用仍不清楚,其确切作用机制及信号通路仍有待更深入的研究。

在脓毒症及脓毒性休克病理过程中,T 细胞反应的启动同样意味着 3 种不同类型细胞的反应(抗原呈递细胞、Treg、Th)。因此,抗原呈递细胞尤其是 DCs 与 Treg 的相互作用也是目前研究的焦点所在。DCs 可能通过增加核转录因子 DNA 结合活性,使 Treg 增殖,激发 IL-2 产生和 IL-2 受体表达,从而促进 T 细胞的功能性分化。业已明确,在脓毒症发生发展过程中免疫功能障碍主要是细胞免疫反应低下,而 Treg 通过影响 Th1/2 分化决定着炎症反应的不同结局。故只有洞悉致炎和抗炎作用此消彼长的本质及 Treg 的调节机制,才能把握脓毒症的发病规律,预见疾病的发展方向,从而进行针对性干预。

3 脓毒症时 T 细胞免疫功能障碍及其机制

3.1 T 细胞克隆无反应性:细胞克隆无反应性是指在机体经历严重创伤后,淋巴细胞对特异性抗原刺激无增殖反应,并且细胞因子的生成也明显受抑制的状态。研究表明,在 T 细胞激活过程中,IL-2 以自分泌、旁分泌和内分泌形式作用于 T 细胞,并且是 T 细胞增殖的必要条件。据报道,严重烧伤后 IL-2 产生及 IL-2 mRNA 表达明显下降,IL-2 生成减少与死亡率升高相关。另有资料证实,严重烧伤患者外周循环的淋巴细胞数目明显减少,并且存活者淋巴细胞大部分处于克隆无反应状态。T 细胞克隆无反应性的主要机制包括凋亡对细胞免疫功能的影响和免疫抑制细胞的作用。

3.2 T 细胞的功能性分化:当受到病原微生物等外来抗原刺激时,CD4⁺ Th 活化。Th1 亚群以分泌 IFN- γ 和 TNF- α 为特征,诱导细胞免疫反应;Th2 亚群则主要分泌 IL-4 和 IL-5,诱导 B 细胞的增殖和分化,介导体液免疫反应并与免疫抑制相关。Th2 亚群可使巨噬细胞失活,阻滞炎症反应发展及其引起的组织损害,并且促进抗炎因子合成释放,如 IL-4、IL-10 等,这称为 Th2 型免疫反应。Th2 型免疫反应是机体免疫系统维护自身稳定的负反馈调节机制的重要组成部分,它可以下调促炎因子的合成,并降低局部炎症介质水平。如果 Th2 型免疫反应低下,会导致机体免疫平衡紊乱,进一步恶化则发展为 SIRS,甚至脓毒性休克和 MODS。Th1 和 Th2 亚群平衡与否直接影响着机体的免疫状态,并与疾病的预后密切相关。业已明确,在脓毒症的发展过程中,出现了倾向于 Th2 型的免疫反应,Th2 型细胞因子(IL-4 和 IL-10)生成增多,而 Th1 型细胞因子(IL-12 和 IFN- γ)产生减少,扰乱了机体的细胞免疫功能。应用 IL-12 纠正 Th2 型免疫反应则能明显提高脓毒症动物的生存率。

3.3 T 细胞凋亡及其调控途径:脓毒症过度而持久的炎症反应可以阻滞 T 细胞活化,导致 T 细胞低反应性、细胞因子产量降低甚至发生凋亡。据报道,因脓毒症死亡的患者中有 50% 存在淋巴细胞凋亡增加现象,尽管 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞的数量未减少,但 CD4⁺ T 细胞和 B 细胞的数量明显下降,淋巴细胞对凋亡刺激信号的敏感性明显增加,大量出现凋亡。凋亡的发生机制相当复杂,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)、Bcl 家族、线粒体、TNF- α /TNF- α 受体(TNFR)、Fas/Fas 配体(FasL)等都对凋亡具有重要的调控作用。①caspase 家族成员是与凋亡密切相关的一组蛋白酶,caspase 的过度表达可诱导细胞凋亡的发生,其中 caspase-3 在凋亡的调节中起着核心作用。脓毒症时,caspase-3 活化后可诱导大量淋巴细胞凋亡,抑制 caspase-3 则能够拮抗淋巴细胞凋亡,恢复淋巴细胞的活性,并可改善动物免疫功能和预后。此外,caspase-8、caspase-9 及 caspase-12 也都与 T 细胞凋亡密切相关。②Bcl 家族是一组与线虫抗凋亡基因 CED-9 同源的蛋白质,对 T 细胞的凋亡起精细调控作用。业已明确,Bcl 家族中分为促凋亡(Bax 和 BH3 亚家族)和抑凋亡(Bcl-2 亚家族)两类成员。Bcl-2 过度表达促进了淋巴细胞存活;相反,Bcl-2 表达下调则对成熟及非成熟淋巴细胞的生存不利;在内毒素诱导的肝细胞凋亡中,凋亡随 Bcl-2 减少和 Bax 增加而明显增多,两类成员的表达比例与淋巴细胞是否出现凋亡有关。③线粒体至少通过释放诱发 caspase 激活蛋白,破坏电子转移、氧化磷酸化和三磷酸腺苷生成,改变线粒体诱导氧化的膜势能 3 种机制参与调节 T 细胞凋亡过程。④TNF- α 主要通过 TNFR1 结合而激活 caspase-2 促进细胞凋亡,同时还能与 TNFR2 结合激活 c-Jun 氨基末端激酶和核转录因子- κ B(NF- κ B)而抑制凋亡。⑤Fas 介导的凋亡在清除外周激活 CD4⁺ T 细胞中起着重要作用,并介导细胞毒性 T 细胞及 NK 细胞杀伤病毒感染细胞和癌细胞。FasL 与 Fas 结合后使胞浆中 Fas 相关的死亡结构域蛋白(FADD)与 Fas 受体的死亡结构域作用,激活 caspase-8 引起凋亡。此外,FasL 与其受体结合通过引起线粒体细胞色素 C 释放、激活 caspase-8 等途径促进凋亡。

总之,随着对脓毒症病理生理过程认识的加深和现代分子生物学技术的应用,人们对于脓毒症的发病过程有了更深的了解。大量研究表明,脓毒症的发生与免疫功能紊乱密切相关,因此,深入探讨脓毒症中免疫功能紊乱的病理生理基础,可进一步阐明脓毒症发病机制的根本及其调节途径,为预防和治疗开拓新思路。

(收稿日期:2006-12-30) (本文编辑:李银平)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

中国科协主管,中国中西医结合学会主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-93

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号 邮编:300050