

# 血清可溶性 CD40 配体对脓毒症的早期诊断价值及严重程度的关联

严一核 孙雪东 邢海波 茅尧生

**摘 要** **目的** 探讨血清可溶性 CD40 配体(soluble CD40 ligand)对脓毒症患者早期诊断的价值及疾病程度的意义。**方法** 采用前瞻性、观察性、临床对照研究方法,以 2011 年 1 月~2012 年 10 月绍兴市人民医院重症监护病房(ICU)收治的 54 例符合全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome)的患者为研究对象,依据 1991 年美国胸科医师协会和危重症医学学会(ACCP/SCCM)诊断标准分为 SIRS 组(26 例)和脓毒症组(28 例),根据脓毒症患者是否存在顽固性低血压、低灌注或器官功能障碍分脓毒症休克组(12 例),脓毒症组(16 例)。患者入院后行常规检查,记录各项生化指标数据,进行急性生理与慢性健康状况评分系统 II(APACHE II)以及脓毒性相关器官功能衰竭评分系统(SOFA)评分。酶联免疫吸附法(ELISA)定量检测血清 sCD40L 浓度,组织因子(TF)抗原。应用 SPSS 16.0 统计分析软件进行数据处理,绘制受试者工作特征曲线(ROC),计量资料采用方差或 Mann-Whitney U 检验,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,采用 Spearman 法进行参数相关性分析。**结果** SIRS 组血清 sCD40L、PCT 低于脓毒症组患者;脓毒症组 PLT,较之 SIRS 组明显较少;血清 sCD40L 诊断脓毒症的曲线下面积为 0.848,优于 CRP 和 PCT,以 2.75ng/ml 为最佳截断值,敏感度为 89.3%,特异性为 82.1%;合并休克的脓毒症患者血清 sCD40L、SOFA 评分显著高于未发生休克患者;血清 sCD40L 水平与 TF 呈正相关,相关系数为 0.57( $P < 0.01$ ),与 PLT 呈负相关,相关系数为 -0.118( $P < 0.01$ )。**结论** 血清 sCD40L 水平对脓毒症早期诊断有一定价值,高水平的 sCD40L 预示脓毒性休克的发生。

**关键词** 脓毒症 诊断 可溶性 CD40 配体 脓毒性休克 降钙素原

**Early Diagnostic Value and Prognostic Severity of Serum Soluble CD40 Ligand in Patients with Sepsis.** Yan Yihe, Sun Xuedong, Xing Haibo, Mao Yaosheng. The First Clinical Medical Institute of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the early diagnosis and severity in sepsis patients. **Methods** The present study is a prospective, observational and randomly control clinical trial. Fifty-four systemic inflammatory response syndrome (SIRS) patients who admitted to the intensive care unit(ICU) of Shaoxing People's hospital from January 2011 to October 2012 were recruited. According to the diagnostic criteria made by ACCP and SCCM in 1991 all patients were divided into two groups: SIRS group ( $n = 26$ ) and Sepsis group ( $n = 28$ ). Based on whether sepsis patients had refractory hyotension, low histic irrigation and organ dysfunction, they were divided into septic shock group ( $n = 12$ ) and no-septic shock group ( $n = 16$ ). After patients were hospitalized, routine examinations and evaluated by APACHE II and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score system. Serum concentration of sCD40L and tissue factor(TF) were measured by enzyme linked immunoabsorbant assay (ELISA). Statistical analyses were conducted by SPSS 16.0. The cut-off value, sensitivity and specificity of sCD40L in sepsis diagnosis were calculated by receiver operating characteristic curve(ROC). Quantitative data were analyzed by  $F$ -test or Mann-Whitney  $U$  test. Enumeration data were compared by chi square test. Correlation of the parameters was analysed by Spearman test. **Results** Compared with sepsis group, the SIRS group exhibited lower levels of sCD40L and PCT. Serum levels of PLT in sepsis group is much less than SIRS group. Areas under the curve (AUC) of sCD40L in diagnosis of sepsis was 0.848(95% CI:0.747-0.948). Based on a cut-off point of 2.75ng/ml, the sensitivity and specificity of sCD40L in early diagnosis of sepsis was 89.3% and 82.1%. Furthermore, serum sCD40L concentration and SOFA scores were higher significantly in septic shock group in contrast to the no-septic shock group. A positive correlation was found between sCD40L and TF(correlation coefficient = 0.57,  $P < 0.01$ ), while negative correlation between sCD40L and PCT(correlation coefficient = 0.118,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Serum sCD40L may be an useful biomarker for diagnose sepsis. Additionally, high levels of sCD40L predicts occurrence of septic shock.

**Key words** Sepsis; Diagnosis; Soluble CD40 ligand; Septic shock; Procalcitonin

作者单位:325035 温州医学院第一临床学院(严一核、茅尧生);312000 浙江省绍兴市人民医院重症医学科(孙雪东、邢海波)

通讯作者:茅尧生,主任医师,硕士生导师,电子信箱:mys5959@163.com

脓毒症是临床重症监护病房(ICU)常见的一类由病原微生物引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),进一步发展可致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[1]</sup>。脓毒症病情进展迅速,病死率高,给目前危重症治疗带来极大的困难。隐藏在脓毒症高病死率的之后的重要原因是临床诊断缺乏特异性的指标,因此,寻找能够早期识别与诊断脓毒症生物标志物,是提高脓毒症治疗成功率的有效手段<sup>[2]</sup>。

CD40L是肿瘤坏死因子超家族的成员之一,表达于活化的血小板<sup>[3]</sup>。sCD40L是CD40L的可溶性形式,它们通过与免疫细胞和血管内皮细胞表面的CD40相结合发挥促炎和促血栓形成效应。在急性冠脉综合征、急性肺损伤、卒中等疾病的患者循环血中sCD40L的含量急剧上升<sup>[4]</sup>。然而,在脓毒症领域,sCD40L的研究相对较少。本研究通过检测临床患者血清中的sCD40L浓度,探讨sCD40L在脓毒症诊断及预后判断中的意义。

### 对象与方法

1. 研究对象:选取绍兴市人民医院重症监护病房2010年10月~2012年11月收治的诊断符合SIRS标准的患者54例,其中有明确的感染或细菌培养阳性证据(脓毒症)患者28例,SIRS诊断标准依据1991年美国胸科医师协会和危重症医学学会(ACCP/SCCM)诊断标准,如出现两种或两种以上的表现,即可认为存在SIRS:①体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$ ;②心率 $>90$ 次/分;③呼吸频率 $>20$ 次/分或 $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$ ;④外周白细胞计数 $>12 \times 10^9/\text{L}$ 或 $<4 \times 10^9/\text{L}$ ,或未成熟粒细胞 $>10\%$ 。顽固性低血压(液体复苏 $\geq 500\text{ml}$ ,收缩压 $<90\text{mmHg}$ )。脓毒症:证实有细菌感染存在或有高度可疑感染灶,余标准同SIRS。脓毒症休克:脓症患者入院12h内予以足量的液体复苏仍无法纠正以下一表现:①低血压(收缩压 $<90\text{mmHg}$ );②神志改变;③动脉缺氧( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 280$ );④乳酸高于正常水平或代酸;⑤少尿[尿量 $<0.5\text{ml}(\text{kg} \cdot \text{h})$ ]。除外标准为:住院时间 $<24\text{h}$ ,孕妇、恶性肿瘤患者,凝血功能障碍者,免疫缺陷患者。本项临床研究经绍兴市人民医院审查批准,严格遵守医学伦理学规范。

2. 研究方法:入选本研究患者均于入院24h内采集静脉血3ml,室温下静置10min后, $4^{\circ}\text{C}$ 下3000r/min,离心10min提取上层血清于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。记录患者年龄、性别、身高、体重、原发疾病等一般资料用于系统评分。免疫比浊法测定血清C反应蛋白(CRP),免疫化学比色法测定血清降钙素原(PCT)均由笔者医院生化室完成。使用人sCD40L ELISA试剂盒(BenderMed systems公司,奥地利)、人TF ELISA试剂盒(American Diagnostica公司,美国)检测各样本sCD40L及TF水平水平,操作步骤严格按照产品说明书进行。

3. 统计学方法:使用SPSS 16.0统计软件进行数据处理,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 $t$ 检验;不符合正态分布的资料以中位数(P25~P75)表示,两组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验;计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验,线性相关性分析采用Spearman法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 临床资料:26例SIRS患者中男性14例,女性12例,患者年龄26~75岁,平均年龄为 $51.8 \pm 13.3$ 岁,平均体重指数为 $23.7 \pm 1.3\text{kg}/\text{m}^2$ ,死亡患者4例,病死率为15.38%;脓毒症组患者男性为15例,女性为13例,患者年龄20~77岁,平均年龄 $54.7 \pm 14.9$ 岁,体重指数 $23.3 \pm 1.3\text{kg}/\text{m}^2$ ,死亡数为12例,病死率43.86%。两组患者在性别构成、年龄、体重指数方面无显著性差异( $P > 0.05$ ),具有可比性。

表1 入选患者的一般资料

| 组别       | $n$<br>(男性/女性) | 年龄(岁)           | 体重指数<br>( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) | 死亡  |        |
|----------|----------------|-----------------|------------------------------------|-----|--------|
|          |                |                 |                                    | $n$ | 病死率(%) |
| SIRS组    | 26(14/12)      | $51.8 \pm 13.3$ | $23.7 \pm 1.3$                     | 4   | 15.38  |
| 脓毒症组     | 28(15/13)      | $54.7 \pm 14.9$ | $23.3 \pm 1.3$                     | 12  | 42.86  |
| $\chi^2$ | 0.000          | 0.745           | 1.082                              | -   |        |
| $P$      | 0.98           | 0.46            | 0.28                               | -   |        |

2. 各项检测指标与脓毒症是否发生的关系:脓毒症组血清sCD40L、PLT、PCT 3个指标与SIRS组相比有显著差异,而两组患者的血清TF、CRP水平,乳酸值以及APACHE II评分相比较没有统计学意义(表2)。

表2 两组患者血清sCD40L和其他临床指标

| 组别    | $n$ | sCD40L<br>( $\text{ng}/\text{ml}$ ) | TF<br>( $\text{pg}/\text{ml}$ ) | PLT<br>( $\times 10^9/\text{L}$ ) | BLA<br>( $\text{mmol}/\text{L}$ ) | APACHE<br>II评分 | CRP<br>( $\text{mg}/\text{L}$ ) | PCT<br>( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) |
|-------|-----|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| SIRS组 | 26  | 2.7<br>(2.1~3.4)                    | $103.2 \pm 10.3$                | $205.7 \pm 51.1$                  | 1.65<br>(1.12~2.13)               | $10.1 \pm 4.9$ | 20.9<br>(14.3~23.1)             | $3.0 \pm 1.6$                     |
| 脓毒症组  | 28  | 4.1<br>(3.0~4.6)                    | $106.5 \pm 12.4$                | $151.5 \pm 58.4$                  | 1.69<br>(0.98~2.75)               | $16.1 \pm 6.7$ | 23.7<br>(17.4~28.8)             | $5.3 \pm 1.7$                     |
| $Z/t$ | -   | 4.386                               | 1.005                           | 3.617                             | 0.667                             | -1.196         | 1.775                           | 4.779                             |
| $P$   | -   | 0.000                               | 0.306                           | 0.001                             | 0.505                             | 0.239          | 0.076                           | 0.000                             |

3. 血清 sCD40L、CRP 及 PCT 诊断脓毒症的 ROC 曲线分析:血清 sCD40L、CRP、PCT 诊断脓毒症的曲线下面积分别为 0.848、0.817、0.641(表 3,图 1),sCD40L 和 PCT 诊断脓毒症的效能优于 CRP。对以上 3 个指标的截断值进行确定后,敏感度最高的为 PCT,2.35 $\mu$ g/L,92.2%;特异性最佳的为 sCD40L,2.75ng/ml,82.1%。

表 3 血清 sCD40L、CRP 及 PCT 对脓毒症早期诊断的性能比较

| 项目     | 截断值   | 敏感度 (%) | 特异性 (%) | 曲线下面积 (AUC) | 95% 可信区间 (95% CI) |
|--------|-------|---------|---------|-------------|-------------------|
| sCD40L | 2.75  | 89.3    | 82.1    | 0.848       | 0.747 ~ 0.948     |
| PCT    | 2.35  | 92.2    | 80.7    | 0.817       | 0.700 ~ 0.933     |
| CRP    | 18.35 | 78.6    | 71.4    | 0.641       | 0.492 ~ 0.790     |

4. 血清 sCD40L、CRP 及 PCT 与脓毒性休克的关系:脓毒症休克组血清 sCD40L,较之对照组,明显升高,有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 4)。休克患者平均 SOFA 评分为  $9.3 \pm 2.6$  显著高于未发生休克患者。

表 4 脓毒症患者与脓毒性休克患者血清 sCD40L 和其他临床指标的差异

| 组别         | <i>n</i> | sCD40L (ng/ml)     | CRP (mg/L)            | PCT ( $\mu$ g/L) | SOFA 评分       | APACHE II 评分   |
|------------|----------|--------------------|-----------------------|------------------|---------------|----------------|
| 脓毒症组       | 16       | 3.6<br>(2.8 ~ 4.4) | 21.9<br>(14.2 ~ 27.5) | $5.06 \pm 1.5$   | $7.8 \pm 2.2$ | $14.4 \pm 6.0$ |
| 脓毒症休克组     | 12       | 4.5<br>(3.9 ~ 5.5) | 25.9<br>(20.8 ~ 30.3) | $5.52 \pm 2.1$   | $9.3 \pm 2.6$ | $17.6 \pm 5.9$ |
| <i>Z/t</i> | —        | 2.278              | 1.346                 | 0.679            | 2.756         | 1.435          |
| <i>P</i>   | —        | 0.023              | 0.178                 | 0.503            | 0.011         | 0.163          |

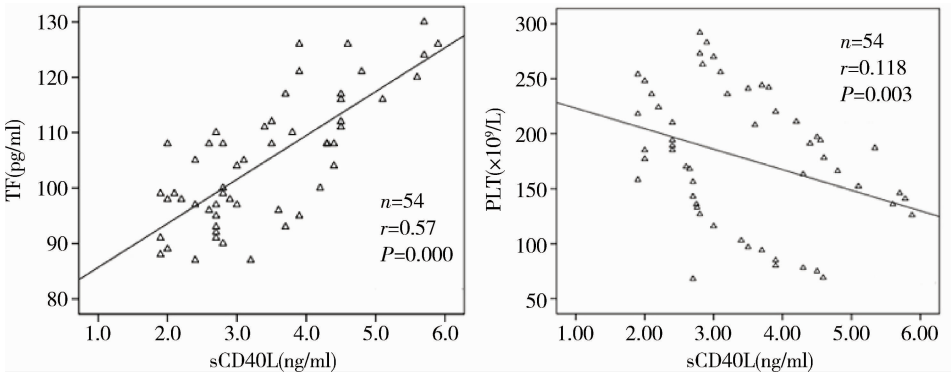


图 2 所有患者血清 sCD40L 与 TF 和 PLT 的相关性

讨 论

研究证实,循环中的 sCD40L 主要来源于活化的血小板上 CD40L 脱落而形成<sup>[3]</sup>。血液中的 sCD40L

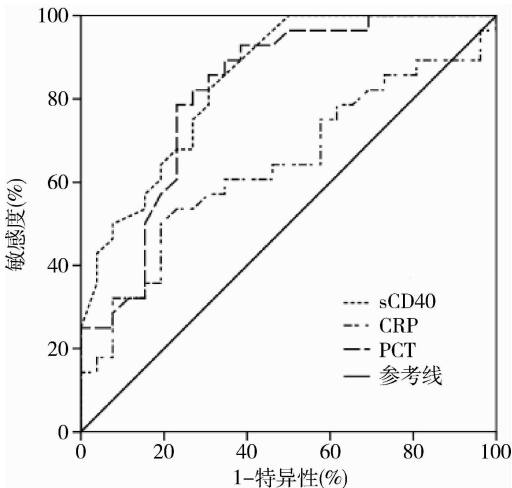


图 1 sCD40L、PCT 和 CRP 诊断脓毒症的受试者工作曲线

此外,休克组的 CRP、PCT 以及 APACHE II 评分的均值均高于未休克组,但是差异无统计学意义。

5. 血清 sCD40L 与 TF 或 PLT 相关性:如图 2,血清 sCD40L 水平与 TF 呈正相关,相关系数为 0.57( $P < 0.01$ ),与 PLT 呈负相关,相关系数为  $-0.118(P < 0.01)$ 。

经外周循环游离于全身各组织器官,可通过与多种细胞表面的 CD40 受体相结合,发挥多种效应:①在单核-吞噬细胞系中,CD40 受体的活化可明显增加

TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎症细胞因子的合成与释放<sup>[5]</sup>；②在血管内皮细胞中，CD40 受体的活化能够促进黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的表达，增强内皮细胞的黏附作用<sup>[6]</sup>；③在血小板中，sCD40L 通过形成 GP II b/III a 配体，激活血小板，促进血栓形成<sup>[7]</sup>。因此，sCD40L-CD40 轴被认为是联系炎症、凝血以及血栓形成的重要信号通路，其在脓毒症领域的研究也成为研究人员关注的热点。

Rahman 等<sup>[8]</sup>发现脓毒症模型的小鼠血浆 sCD40L 水平较之正常小鼠明显升高，另一方面，脓毒症小鼠的血小板表面 CD40L 表达下降，提示在脓毒症状态下，机体内的血小板表面的 CD40L 大量剪切/脱落至外周循环血中。笔者通过对临床患者外周血进行检测得出类似的结果。从表 2 中可见脓毒症患者 sCD40L 水平明显高于 SIRS 组，与此同时，脓毒症组的血小板计数也有一定数量的下降，而其他相关指标，仅有 PCT 可以准确的区分脓毒症与 SIRS 患者。CRP 是由肝脏合成的急性期蛋白，在急性炎症反应发生时，大量合成释放，而 PCT 作为降钙素的前体，体内的半衰期约为 20~24h，稳定性好，它在脓毒症早期诊断中的重要作用已在多项大规模临床对照研究中得以证实<sup>[9]</sup>。通过受试者工作曲线(ROC)的分析，血清 sCD40L 在脓毒症诊断的特异性、敏感度方面都优于 CRP，而与 PCT 在诊断性能上则难分伯仲，可能需要更多病例数量才能明确。血清 sCD40L 不仅对脓毒症诊断有参考价值，对其死亡预后的判断也有一定意义。血清 sCD40L 以 3.5ng/ml 为截断值对 30 天死亡预后判断的曲线下面积(AUC)可达 0.58<sup>[10]</sup>。此外，一项以儿童脑膜炎继发脓毒症的研究中，49 例患者的 sCD40L 浓度明显上升，但是血小板的数量却与对照组没有差异，导致与本研究结果不同的因素可能是小儿与成人在造血功能及生理发育上的差异所造成<sup>[11]</sup>。

Chew 等<sup>[12]</sup>以是否发生休克为界限，将患者分成休克组和未休克组。发生休克的患者 sCD40L 含量显著超过为未休克组，说明机体有效循环血容量不足时，sCD40L 将更多地释放入血。本研究依据脓毒症休克判定标准进行分组，分析数据提示血清 CRP、PCT 均不能反映脓毒症休克状态( $P > 0.05$ )，反之两组患者 sCD40L 的比较则有显著性差异( $P < 0.05$ )，同时 SOFA 评分对休克的判断也具有较高的参考价值。

既然 sCD40L 主要来源于血小板，而血小板又是外周血中对内毒素敏感的成分，在重度感染早期即有

变化，有研究指出，脓毒症患者血小板进行性下降提示病情危重，预后差<sup>[13]</sup>。本研究结果说明，sCD40L 水平与 PLT 呈负相关，提示 PLT 活化后，释放成分(如 sCD40L)增加，破坏增多，而 TF 的增加可以促进凝血，恰恰迎合了 sCD40L 促血栓形成的效应。创伤、外伤及大手术是引发脓毒症的常见病因，Johansson 等认为在创伤、外伤的早期即有 sCD40L 的增加，早期血液中 sCD40L 含量甚至可以作为创伤死亡预后判断的独立因素之一。本研究缺少部分患者 28 天/30 天的死亡信息，对 sCD40L 与脓毒症患者病死率的关系有待进一步研究。

#### 参考文献

- Moreno RP, Metnitz B, Adler L, *et al.* Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response[J]. *Intensive Care Med*, 2008,34(3):496-504
- Chan T, Gu F. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2011,11(5):487-496
- Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004,43(12):2326-2328
- Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, *et al.* The CD40-CD40L system in cardiovascular disease[J]. *Ann Med*, 2011,43(5):331-340
- Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses[J]. *Immunol Today*, 1996,17:487-492
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells[J]. *Nature*, 1998,391(6667):591-594
- Prasad KS, Andre P, He M, *et al.* Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003,100(21):12367-12371
- Rahman M, Zhang S, Chew M, *et al.* Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury[J]. *Ann Surg*, 2009,250(5):783-790
- Castelli GP, Pognani C, Meisner M, *et al.* Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction[J]. *Crit Care*, 2004,8(4):R234-R242
- Lorente L, Martín MM, Varo N, *et al.* Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis[J]. *Crit Care*, 2011,15(2):R97
- Inwald DP, Faust SN, Lister P, *et al.* Platelet and soluble CD40L in meningococcal sepsis[J]. *Intensive Care Med*, 2006,32(9):1432-1437
- Chew M, Rahman M, Ihrman L, *et al.* Soluble CD40L (CD154) is increased in patients with shock[J]. *Inflamm Res*, 2010,59(11):979-982
- Woth G, Varga A, Ghosh S, *et al.* Platelet aggregation in severe sepsis[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011,31(1):6-12

(收稿日期:2013-01-29)

(修回日期:2013-03-18)