

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.11.006

· 论 著 ·

连续性肾替代治疗对脓毒症患者 CD8⁺T 淋巴细胞功能的影响孔令宇¹, 席 璠¹, 马文婷², 刘根生¹

(1 新乡医学院第一附属医院, 河南 新乡 453100; 2 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453100)

[摘要] **目的** 了解脓毒症患者经连续性肾脏替代治疗(CRRT)后外周血 CD8⁺T 淋巴细胞数量变化以及对免疫功能的影响。**方法** 收集 2015 年 10 月—2016 年 8 月入住某院急诊科的脓毒症住院患者的一般资料,并采集经单次 CRRT 前后脓毒症患者外周血,分别检测总 CD8⁺T 细胞的数量、分泌干扰素- γ (IFN- γ)的 CD8⁺T 细胞数、CD8⁺T 细胞产生抑制性分子水平、共刺激分子水平以及分泌 IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果** 共有 37 例脓毒症住院患者,所有患者均为革兰阴性(G⁻)菌感染,感染的细菌种类为肺炎克雷伯菌(22 株)、鲍曼不动杆菌(11 株)、阴沟肠杆菌(3 株)。脓毒症患者经 CRRT 后体温、心率、白细胞计数、尿素氮、肌酐水平较治疗前下降(均 $P < 0.05$)。经 CRRT 后脓毒症患者总 CD8⁺T 细胞数量较治疗前无明显变化($P > 0.05$),但分泌 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞的数量较治疗前升高($P < 0.05$)。同时,经 CRRT 后 CD8⁺T 细胞产生抑制性分子细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)、程序性死亡受体 1(PD-1)、含 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域的分子 3(TIM-3)的水平均较治疗前降低(均 $P < 0.05$),而产生共刺激分子 CD28、分泌 IFN- γ 的水平较治疗前升高(均 $P < 0.05$)。**结论** CRRT 不但有效改善脓毒症患者的生命体征和肾功能,还可增强 CD8⁺T 细胞免疫功能。

[关键词] 脓毒症;连续性肾脏替代治疗;CD8⁺T 淋巴细胞;免疫调节

[中图分类号] R631 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)11-0974-05

Effect of continuous renal replacement therapy on the function of CD8⁺T lymphocytes in patients with sepsis

KONG Ling-yu¹, XI Zan¹, MA Wen-ting², LIU Gen-sheng¹ (1 The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China; 2 Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes in CD8⁺T lymphocyte count and effect on immune function in patients with sepsis after continuous renal replacement therapy (CRRT). **Methods** General data of septic patients who admitted to the emergency department of a hospital between October 2015 and August 2016 were collected, peripheral blood was taken from patients before and after single CRRT, the total CD8⁺T cell count, interferon- γ (IFN- γ)-secreting CD8⁺T cell count, the levels of inhibitory molecules and costimulatory molecules as well as IFN- γ and tumor necrosis factor- α (TNF- α) produced by CD8⁺T cells were detected. **Results** A total of 37 hospitalized septic patients were infected with gram-negative bacteria, pathogens causing infection were *Klebsiella pneumoniae* (22 strains), *Acinetobacter baumannii* (11 strains), and *Enterobacter cloacae* (3 strains). After CRRT, the body temperature, heart rate, white blood cell count, urea nitrogen, and serum creatinine levels in septic patients were all lower than those before CRRT (all $P < 0.05$). After CRRT, the total CD8⁺T cell count in septic patients didn't change significantly ($P > 0.05$), but IFN- γ -secreting CD8⁺T cell count increased ($P < 0.05$). Levels of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(CTLA-4), programmed death-1 (PD-1), T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 3 (TIM-3) after CRRT were all lower than those before CRRT (all $P < 0.05$), while levels of costimulatory molecules CD28 and secreting IFN- γ elevated after CRRT(all $P < 0.05$). **Conclusion** CRRT

[收稿日期] 2017-11-01

[作者简介] 孔令宇(1982-),女(汉族),河南省淇县人,主治医师,主要从事急诊内科研究。

[通信作者] 席璠 E-mail: xizanyisheng@sina.com

can not only improve the vital signs and renal function of patients with sepsis, but also enhance the immune function of CD8⁺ T cells.

[Key words] sepsis; continuous renal replacement therapy; CD8⁺ T lymphocyte; immunoregulation

[Chin J Infect Control, 2018, 17(11):974-978]

脓毒症是重症患者死亡的主要原因之一,脓毒症和脓毒性休克导致的病死率分别高达 50% 和 68%^[1]。脓毒症初期,在细菌内毒素等物质的诱导下,机体分泌大量炎症介质,导致脓症患者体内存在强烈的免疫炎症应答。随着疾病的持续进展,机体出现免疫平衡紊乱和特异性免疫功能失调,使机体难以清除感染^[2],故脓症患者存在着不同程度的细胞免疫功能紊乱或损害。目前国内外对脓毒症免疫障碍机制的研究越来越关注,尤其是经临床治疗后,机体的免疫状态与脓毒症的发生、发展以及预后有着密切关联。近年来,连续性肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy, CRRT)在非肾脏病领域的优势得以凸显,传统抗感染等集束化治疗联合 CRRT 能降低脓毒症患者的炎症反应,并调节机体的免疫应答^[3]。CRRT 主要通过连续清除血液循环中的毒素、中小分子物质、致病介质来维持人体内环境稳定,具有清除率高、血流动力学稳定等优点。既往研究^[4]已发现 CD8⁺ T 细胞参与脓毒症疾病的主要过程,而 CRRT 对脓症患者总 T 细胞数量、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例等无明显影响,但对脓症患者 CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫功能影响尚不明确^[5]。故本研究通过观察脓症患者 CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫功能变化,探究 CRRT 对脓症患者 CD8⁺ T 细胞免疫功能的影响。

1 资料与方法

1.1 资料来源 收集 2015 年 10 月—2016 年 8 月入住某院急诊科的脓毒症住院患者的病历资料。脓毒症的诊断依据 2016 年颁布的 Sepsis 3.0 脓毒症诊断标准^[6];排除标准:既往存在慢性肾衰竭,需规律行透析的患者;接受过心、肾或肝移植术的患者;合并自身免疫性疾病的患者;合并严重基础疾病(如:恶性肿瘤终末期)的患者。本研究已取得患者及家属的知情同意,并签署知情同意书,研究方案经该院伦理委员会审批通过,符合伦理学标准。

1.2 仪器与试剂 淋巴细胞分离液、LPS 试剂均为美国 Sigma 公司产品。人 CD8⁺ T 细胞分离液试剂盒为德国美天旎公司产品。干扰素- γ (interferon-

γ , IFN- γ)酶联免疫斑点检测(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)试剂盒、抗 CD3-FITC 和抗 CD8-APC 均为美国 BD 公司产品。Trizol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品。反转录 PCR 试剂盒 PrimeScript RT reagent kit、实时定量 PCR 试剂盒 STBR Premix Ex Taq 均为 TaKaRa 公司产品。IFN- γ 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒为武汉华美公司产品。Trucount 绝对计数管、CD3/CD4/CD8 荧光标记单克隆抗体、FACS Calibur 流式细胞仪均为美国 BD 公司产品。磁力分离架为德国美天旎公司产品。ELISPOT 读板仪为德国 AID 公司产品。实时定量 PCR 分析仪为美国 ABI 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法 根据《中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)》^[7]的推荐意见,所有脓症患者均给予抗感染、针对原发病的对症支持治疗、机械通气、预防深静脉血栓等集束化治疗,同时所有脓症患者均在发病 7 d 内行单次床旁 CRRT,治疗模式均为连续性静脉-静脉血液滤过(CVVHF),血流量为 180 mL/min,置换液量为 4 L/h,持续透析 24 h。滤器包括聚砜膜和 AV69 膜,血管通路均为股静脉置管,置换液为碳酸氢盐置换液,抗凝方式包括枸橼酸和低分子肝素抗凝。

1.3.2 研究方法

1.3.2.1 外周血单个核细胞(PBMCs)的分离 分别于 CRRT 前后采集脓毒血症患者 EDTA 抗凝外周血 10 mL,使用密度梯度离心法分离 PBMCs (10⁷ 个/mL),于 37℃、5% CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养基进行培养。

1.3.2.2 CD8⁺ T 淋巴细胞的纯化与计数 应用磁珠分离法纯化 CD8⁺ T 淋巴细胞:取 10⁷ 个 PBMCs,离心后应用 40 μ L 缓冲液重悬细胞,加入 10 μ L 生物素标记的抗体鸡尾酒,混匀后于 4℃ 静置孵育 5 min,加入 30 μ L 缓冲液和 20 μ L CD8⁺ T 细胞免疫磁珠鸡尾酒,混匀后于 4℃ 静置孵育 10 min,将细胞悬液加入分离柱中,收集流出液,其中含有未被标记的富集的 CD8⁺ T 淋巴细胞。应用流式细胞术检

测 CD8⁺ T 淋巴细胞计数:向 TruCOUNT 绝对计数管中准确加入 20 μL CD3/CD4/CD8 荧光标记单克隆抗体和 50 μL 抗凝全血,4℃ 避光孵育 15 min 后加入 450 μL FACS 红细胞裂解液,室温避光孵育 45 min,应用 FACS Calibur 流式细胞仪检测,MultiSET 软件分析 CD8⁺ T 淋巴细胞绝对计数。

1.3.2.3 脂多糖(LPS)刺激后分泌 IFN-γ 的 CD8⁺ T 淋巴细胞数 向包被抗 IFN-γ 单克隆抗体的 96 孔 PVDF 膜板中加入 100 μL PBMCs(10⁶ 个/mL)和 LPS(10 μg/L),阳性对照组加入 PBMCs 和植物血凝素,阴性对照仅加入 PBMCs,于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 12 h,洗涤后每孔加入 100 μL 生物素标记的抗 IFN-γ 单克隆抗体,室温孵育 1 h,洗涤后每孔加入 100 μL 碱性磷酸酶标记的链球菌亲和素,室温避光孵育 45 min,洗涤后加入显色剂反应 15~20 min。终止反应后使用 ELISPOT 读板仪计数,以斑点形成细胞数(spot forming cells, SFC)/10⁶ PBMCs 为单位计数产生 IFN-γ 的 CD8⁺ T 淋巴细胞。

1.3.2.4 检测 CD8⁺ T 细胞中细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)、程序性死亡受体 1(PD-1)、T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域的分子 3(TIM-3)、CD28、IFN-γ、TNF-α 的表达 应用实时定量 PCR 检测 CD8⁺ T 细胞 CTLA-4、PD-1、含 TIM-3 和 CD28 的表达:取 10⁶ 个分离的 CD8⁺ T 细胞,加入 LPS 刺激培养 6 h,收集细胞和培养上清进行后续实验。将收集的细胞于 2 h 内使用 Trizol 试剂提取总 RNA。建立反转录反应体系,反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s。建立 SYBR 实时定量 PCR 反应体系,反应条件:预变性(95℃,30 s);PCR 反应(95℃,5 s;60℃,30 s)。应用 2^{-ΔΔCT} 法对目的片段的相对表达水平进行分析。引物序列如表 1 所示。收集培养上清,应用 ELISA 试剂盒检测培养上清中 IFN-γ、TNF-α 的表达水平。

1.4 统计分析 应用 SPSS 19.0 统计软件,正态分布计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后均数比较采用配对 *t* 检验;非正态分布计量资料以中位数 *M*(*P*₂₅, *P*₇₅)表示,治疗前后比较采用 Wilcoxon 配对检验。以 *P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5'—3')
CTLA-4 上游	CCT GGA GAT GCA TAC TCA CAC ACA
CTLA-4 下游	GGA TTT CAG CGG CAC AAG G
PD-1 上游	GCG TGA CTT CCA CAT GAG C
PD-1 下游	GCA GGC TCT CTT TGA TCT GC
TIM-3 上游	AAT GAA CTG GGA CCT GCA C
TIM-3 下游	CTT TCA CCT CAG CAC CCA GT
CD28 上游	TCC ATG TGA AAG GGA AAC ACC
CD28 下游	AGC CAG GAC TCC ACC ACC C
β-actin 上游	TGG CAC CAG CAC AAT GAA
β-actin 下游	CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A

2 结果

2.1 一般资料 2015 年 10 月—2016 年 8 月共有 37 例脓毒症住院患者符合入选条件,其中男性 23 例,女性 14 例,平均年龄为(49.83 ± 11.52)岁。引发脓毒症病因有肺部感染(22 例)、腹腔感染(10 例)、急性重症胰腺炎(2 例)、多发伤(2 例)、植入物感染(1 例)。所有患者血培养均为革兰阴性(G⁻)菌,其中感染的细菌种类为肺炎克雷伯菌(22 株)、鲍曼不动杆菌(11 株)、阴沟肠杆菌(3 株)。

2.2 CRRT 前后患者一般情况比较 脓症患者接受 CRRT 后平均动脉压、血红蛋白、血小板计数、清蛋白、血钾、血钠、APACHE II 评分、SOFA 评分较治疗前均无明显变化(均 *P* > 0.05);体温、心率、白细胞计数、尿素氮、血肌酐水平均较治疗前下降,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。见表 2。

2.3 CRRT 前后总 CD8⁺ T 细胞数量和分泌 IFN-γ 的 CD8⁺ T 细胞数量 脓症患者总 CD8⁺ T 细胞数量在 CRRT 前后无明显变化(*P* > 0.05);CRRT 后分泌 IFN-γ 的 CD8⁺ T 细胞数量较治疗前升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

2.4 CRRT 前后 CTLA-4、PD-1、TIM-3、CD28、IFN-γ、TNF-α 表达情况 脓症患者经 CRRT 后 CD8⁺ T 细胞(受 LPS 刺激后)产生抑制性分子 CTLA-4、PD-1、TIM-3 mRNA 的水平均较治疗前降低,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05);而产生共刺激性分子 CD28 mRNA 的水平较治疗前升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);CRRT 后 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN-γ 的水平较治疗前升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05),但分泌 TNF-α 的水平治疗前后无明显变化(*P* > 0.05)。见表 4。

表 2 CRRT 前后脓毒症患者一般情况比较

Table 2 Comparison of general condition of septic patients before and after CRRT

基本信息	治疗前	治疗后	t/Z	P
体温(°C)	39.03 ± 0.81	37.58 ± 0.59	4.998	0.015
心率(次/分)	122.01 ± 6.78	100.50 ± 10.28	4.879	0.016
平均动脉压(mmHg)	75.50 ± 6.46	77.75 ± 4.03	1.192	0.319
白细胞($\times 10^9/L$)	19.21(9.88, 57.09)	13.78(7.23, 38.07)	-2.163	0.033
血红蛋白(g/L)	98.83(68.90, 158.11)	102.82(59.84, 143.32)	-0.932	0.367
血小板($\times 10^9/L$)	104.31(28.09, 221.72)	96.12(37.10, 198.31)	-1.305	0.306
清蛋白(g/L)	28.31 ± 8.77	29.71 ± 10.10	0.338	0.738
钾(mmol/L)	4.27 ± 0.91	4.41 ± 0.84	2.119	0.086
钠(mmol/L)	134.20 ± 7.74	135.62 ± 8.61	1.621	0.116
尿素氮(mmol/L)	337.20(107.13, 672.32)	201.20(78.98, 445.34)	-2.664	0.007
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	19.22(8.71, 29.08)	15.09(7.75, 20.87)	-2.663	0.009
APACHE II 评分(分)	20.01(13.03, 31.01)	19.02(12.03, 28.02)	-0.584	0.548
SOFA 评分(分)	11.50(7.02, 15.01)	10.01(6.01, 15.50)	-0.308	0.779

表 3 CRRT 前后总 CD8⁺ T 细胞和分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞数量比较Table 3 Comparison of total CD8⁺ T cell count and IFN- γ -secreting CD8⁺ T cell count before and after CRRT

组别	总 CD8 ⁺ T 细胞 (个/ μL)	分泌 IFN- γ 的 CD8 ⁺ T 细胞 (SFC/ 10^6 PBMCs)
治疗前	450.50 ± 62.98	40.25 ± 9.00
治疗后	426.80 ± 84.56	91.25 ± 21.58
t	0.434	3.584
P	0.694	0.037

3 讨论

随着对 CRRT 认识的深入和技术的完善, CRRT 在脓毒症治疗中的作用已得到了广泛认可。CRRT 不仅能有效清除脓毒症患者中小分子溶质、与脓毒症相关的炎症因子、纠正电解质和酸碱平衡紊乱,而且还可在稳定血流动力学的基础上改善免疫应答失衡、保护重要脏器功能、维持内环境稳

表 4 CRRT 前后 CD8⁺ T 细胞中抑制性分子、CD28 mRNA 及分泌细胞因子变化Table 4 Changes in inhibitory molecules, CD28 mRNA, and secretory cytokines in CD8⁺ T cells before and after CRRT

组别	CTLA-4	PD-1	TIM-3	CD28	IFN- γ (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
治疗前	1.02 ± 0.04	1.18 ± 0.13	1.07 ± 0.19	1.01 ± 0.05	22.68 ± 6.96	171.10 ± 53.60
治疗后	0.59 ± 0.15	0.80 ± 0.08	0.57 ± 0.09	3.26 ± 0.86	50.76 ± 9.13	171.80 ± 61.22
t	5.633	3.951	5.794	5.455	5.776	0.031
P	0.011	0.029	0.01	0.012	0.01	0.977

态^[8-9]。因此,无论脓毒症患者是否存在急性肾功能-损伤,均可在集束化治疗的基础上加用 CRRT,最终降低脓毒症患者病死率。本研究发现脓毒症患者经 CRRT 后,白细胞计数、尿素氮、血肌酐较治疗前改善,提示 CRRT 对小分子溶质有良好的清除作用;同时患者体温、心率较治疗前下降,考虑不但与炎症介质清除有关,还可能与治疗时置换液的温度导致物理降温有关。患者 CRRT 前后平均动脉压、血红蛋白、清蛋白、血钾、血钠均未见明显变化,提示 CRRT 具有良好的血流动力学稳定性,且对患者的营养状态影响不大,进一步证实了 CRRT 对脓毒症患者的安全性和有效性^[10]。

既往研究^[11]表明,脓毒症患者通常对由 CD8⁺ T 细胞控制的细胞内病原体的“继发性”感染高度敏

感。在外源性致敏源的刺激下,CD8⁺ T 细胞通过特异性识别由 MHC I 类分子提呈的内源性抗原肽,进而杀伤病原体感染的细胞或肿瘤细胞,在感染和肿瘤免疫中发挥重要作用;CD8⁺ T 细胞发挥细胞毒性作用可通过分泌细胞因子、调控靶细胞坏死和凋亡等机制实现,同时多种因素可调控 CD8⁺ T 细胞免疫功能^[12]。Burnner 等^[13]研究已证实,在严重脓毒症发展过程中出现了倾向于 Th2 型的免疫反应,即 T 细胞免疫有向 Th2 方向漂移趋势,明显损害了机体的细胞免疫功能。由于本研究中 CD8⁺ T 细胞免疫功能需要对其进行刺激培养,对脓毒症患者而言,G⁻菌感染占大多数,同时 LPS 作为 G⁻菌细胞壁最外层的类脂多糖类物质,虽抗原性较弱,但毒性作用大致相同,可引起发热、微循环障碍、休克等症状;

因此,在本研究中选择了 G⁻ 菌感染所致的脓毒症患者作为研究对象,使用 LPS 作为刺激源对脓症患者 CD8⁺ T 细胞免疫功能进行分析。本研究发现,脓症患者在接受 CRRT 前后总 CD8⁺ T 细胞的数量无明显变化,与既往研究^[5] 结果一致。但在 LPS 刺激下,无论总 PBMCs 中分泌 IFN- γ 的细胞数量还是分离纯化的 CD8⁺ T 细胞直接分泌 IFN- γ 的水平,在 CRRT 后均明显升高,提示 CRRT 可提升 CD8⁺ T 细胞分泌细胞因子的能力。IFN- γ 是杀伤细胞内寄生病原体的主要细胞毒性因子,进一步提示 CRRT 可提升 CD8⁺ T 细胞的细胞杀伤功能,进而有效控制脓毒症的病情进展。

然而,CRRT 提升 CD8⁺ T 细胞免疫功能的机制尚不清楚,抑制性免疫分子可调控 CD8⁺ T 细胞免疫功能。在脓症患者中,抑制性免疫分子 PD-1、CTLA-4 和 TIM-3 在 CD8⁺ T 细胞中的表达升高,提示上述抑制性因子可促进脓症患者 CD8⁺ T 细胞衰竭,抑制免疫应答,导致机体不能清除病原体而使疾病进展^[14]。同时,PD-1/PD-L1 和 TIM-3 信号通路均可作为预测脓毒症/脓毒性休克治疗效果和预后的指标^[15-17]。本研究发现,脓症患者经 CRRT 后,即使经 LPS 刺激,分离纯化的 CD8⁺ T 细胞中 PD-1、CTLA-4 和 TIM-3 的表达水平明显降低,而共刺激分子 CD28 水平显著升高,提示 CRRT 可通过降低抑制性免疫分子的表达促进 CD8⁺ T 细胞免疫功能,但这种作用是直接性还是间接性还有待进一步研究,同时在患者免疫系统中体液免疫和细胞免疫之间的相互作用,未作为研究的关注点。本次研究未包含革兰阳性菌感染的脓毒血症患者,由于不同种类的细菌代谢产物等有所不同,可能对 CD8⁺ T 细胞免疫功能的激活途径不同,希望后期实验对这个因素进行排除干扰。

总之,CRRT 在脓毒症患者的治疗中具有良好的安全性和有效性,不但能改善脓毒症患者的生命体征和肾功能,还可增强脓症患者外周血 CD8⁺ T 细胞免疫功能,促进机体清除病原体感染,对降低脓症患者病死率和改善预后均具有重要意义。

[参考文献]

[1] Kadri SS, Rhee C, Strich JR, et al. Estimating ten-year trends in septic shock incidence and mortality in United States Academic Medical Centers using clinical data[J]. *Chest*, 2017, 151(2): 278-285.

[2] Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16045.

[3] Hanafusa N. Application of continuous renal replacement therapy: what should we consider based on existing evidence? [J]. *Blood Purif*, 2015, 40(4): 312-319.

[4] Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, et al. Immune cell phenotype and function in sepsis[J]. *Shock*, 2016, 45(3): 282-291.

[5] 聂祥碧, 卢院华, 郭经华, 等. CRRT 不同模式治疗对重症脓毒症免疫功能的影响[J]. *江西医药*, 2016, 51(7): 635-637.

[6] Shankar-Hari M, Phillip GS, Levy ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 775-787.

[7] 中华医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(6): 401-426.

[8] 陆任华, 朱铭力, 方燕, 等. CRRT 在脓毒血症患者中的疗效观察[J]. *中国血液净化*, 2013, 12(12): 651-656.

[9] 郭蕾, 陈建时, 戴凌燕, 等. 持续血液滤过治疗脓毒血症患者急性肾衰竭临床疗效[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(13): 3250-3252.

[10] Joannidis M. Continuous renal replacement therapy in sepsis and multisystem organ failure[J]. *Semin Dial*, 2009, 22(2): 160-164.

[11] Condotta SA, Rai D, James BR, et al. Sustained and incomplete recovery of naive CD8⁺ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8⁺ T cell responses to infection[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 1991-2000.

[12] White JT, Cross EW, Kedl RM. Antigen-inexperienced memory CD8⁺ T cells: where they come from and why we need them[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(6): 391-400.

[13] Brunner M, Krenn C, Roth G, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(7): 1468-1473.

[14] Gao DN, Yang ZX, Qi QH. Roles of PD-1, Tim-3 and CTLA-4 in immunoregulation in regulatory T cells among patients with sepsis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18998-19005.

[15] Wang F, Hou H, Xu L, et al. Tim-3 signaling pathway as a novel negative mediator in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock[J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(5): 470-478.

[16] Ren F, Li J, Jiang X, et al. Plasma soluble Tim-3 emerges as an inhibitor in sepsis: sepsis contrary to membrane Tim-3 on monocytes [J]. *Tissue Antigens*, 2015, 86(5): 325-332.

[17] Patera AC, Drewry AM, Chang K, et al. Frontline science: defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(6): 1239-1254.