

面多、渗出量大,故所置静脉导管接头及置管部位较易受创面细菌污染<sup>[1-3]</sup>。导管作为异物存在于血管中 1~2 d 后,导管内可出现纤维蛋白沉积,导管内膜形成一层疏松的纤维蛋白鞘,这些沉积物是微生物的良好培养基,可包裹并保护病原微生物免受宿主吞噬细胞和抗生素破坏<sup>[4]</sup>。

导管培养菌落包括细菌和真菌,种类繁多,但大致与创面常见病菌相似。本组病例静脉导管检出细菌以大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌多见,其次是甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌,与文献报道结果<sup>[1-2,5-6]</sup>相似。本研究结果显示,有创面置管组细菌培养阳性率较无创面置管组高。静脉导管留置时间越长,相关感染发生的机会越多,留置时间小于 4 d,脓毒症发生率;大于 4 d,脓毒症发生率明显增加<sup>[7]</sup>。提示严重烧伤患者应尽量不经创面置管,且置管时间应尽量小于 4 d。部分患者经严密观察、加强局部护理与消毒,可以适当延长静脉导管留置时间。

因患者不同部位间各方面差距大,难以判断哪个部位更容易致感染。革兰阴性杆菌易引发导管脓毒症,应密切注意患者体温变化及其他感染征象,一旦观察到置管部位红肿、有脓性分泌物或不明原因发热,应首先考虑导管相关性感染,及时拔管并行导管末端微生物培养,防止脓毒症的发生<sup>[8]</sup>。

本组病例所置导管内均有抗生素输入,难以判断此举能否减少置管相关感染率。初步观察到应用含银抗菌导管未能明显减少相关感染发生率<sup>[9-10]</sup>,留置双腔管与单腔管相关感染的发生率也没有明显差别(另文发表),这二者尚需进行严格大样本观察统计验证。

临床救治大面积烧伤患者时尽量选用外周浅表静脉穿刺输液。如确有必要行深静脉置管时,应严格无菌操作,尽量选择经正常皮肤穿刺置管,加强导管护理,缩短置管时间。同时密切观察患者病情,一旦察觉或疑有置管后相关感染发生时,应及时拔除导管行末端微生物培养及血液培养,明确诊断,及时治疗,勿使病情发展恶化而延误治疗。同时,应早

期积极开展手术等综合治疗措施,消除创面,这对减少深静脉置管术后相关感染亦有重要意义。

## 参考文献

- [1] 张志安,李国辉,苏子毅. 严重烧伤患者静脉导管感染的细菌学调查. 中华烧伤杂志,2003,19(6):366.
- [2] Moore EC, Padiglione AA, Wasiak J, et al. Candida in burns: risk factors and outcomes. J Burn Care Res, 2010,31(2):257-263.
- [3] Gilbert RE, Harden M. Effectiveness of impregnated central venous catheters for catheter related blood stream infection: a systematic review. Curr Opin Infect Dis, 2008,21(3):235-245.
- [4] 向军,孙珍,宋菲,等. 烧伤患者深静脉导管细菌生物膜的形成及意义. 中华烧伤杂志,2010,26(2):95-99.
- [5] 袁康,张延霞,岳素琴. 静脉留置导管感染分析及预防措施. 中华医院感染学杂志,2001,11(1):29-30.
- [6] Costello JM, Graham DA, Morrow DF, et al. Risk factors for central line-associated bloodstream infection in a pediatric cardiac intensive care unit. Pediatr Crit Care Med, 2009,10(4):453-459.
- [7] King B, Schulman CI, Pepe A, et al. Timing of central venous catheter exchange and frequency of bacteremia in burn patients. J Burn Care Res, 2007,28(6):859-860.
- [8] Ramos GE, Bolgiani AN, Patiño O, et al. Catheter infection risk related to the distance between insertion site and burned area. J Burn Care Rehabil, 2002,23(4):266-271.
- [9] Walz JM, Avelar RL, Longtine KJ, et al. Anti-infective external coating of central venous catheters: a randomized, noninferiority trial comparing 5-fluorouracil with chlorhexidine/silver sulfadiazine in preventing catheter colonization. Crit Care Med, 2010,38(11):2095-2102.
- [10] Hagau N, Studniska D, Gavrus RL, et al. Central venous catheter colonization and catheter-related bloodstream infections in critically ill patients: a comparison between standard and silver-integrated catheters. Eur J Anaesthesiol, 2009,26(9):752-758.

(收稿日期:2010-12-02)

(本文编辑:谢秋红)

## 烫伤大鼠肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞亚群及细胞凋亡变化

冯永强 王德昌 王坤 冷向锋 肖虎 郭丹凤

严重烧(创)伤后肠道细菌、内毒素可经淋巴、血液途径移位,肠集合淋巴结生发中心大量淋巴细胞凋亡<sup>[1]</sup>,提示肠道免疫屏障受损。笔者拟观察细菌经淋巴途径移位最后一个环节——肠系膜淋巴结(MLN)T 淋巴细胞亚群及细胞凋亡情况,以了解肠源性感染时淋巴途径免疫状态。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.010

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院烧伤整形科(冯永强、王德昌、肖虎);潍坊市人民医院烧伤整形科(王坤);青岛大学医学院附属医院烧伤整形科(冷向锋);济南市中心医院烧伤整形科(郭丹凤)

通信作者:王德昌,Email:wangdechang0531@126.com,电话:0531-85186369

## 1 材料与方

### 1.1 主要材料

藻红蛋白(PE)-花青类荧光染料 5(Cy5)标记的小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体、R-PE 标记的小鼠抗大鼠 CD8a 单克隆抗体购自美国 BD 公司,膜联蛋白(annexin) V-异硫氰酸荧光素(FITC)和 20 μg/mL 碘化丙啶(PI)购自深圳晶美生物工程有限公司。Beckman Coulter Epics XL-4 型流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司。健康成年雄性 Wistar 大鼠共 40 只,体质量为 220~280 g,由山东大学实验动物中心提供。

### 1.2 实验分组

采用信封法将大鼠随机分为烫伤组(30 只)和假伤组(10 只),实验前 6 h 禁食、自由饮水。参照文献[2]将烫伤

组制成 30% TBSA 深 II 度烫伤模型(经病理切片证实),假伤组大鼠皮肤经 25 °C 水浴 10 s 模拟烫伤(病理切片证实)。

1.3 标本采集

伤后 2、24、72 h 采集烫伤组大鼠 MLN, 每时相点 10 只; 同法采集假伤组 MLN。将 MLN 研磨后制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 备用。

1.4 三色标记流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群

取 100 μL 细胞悬液, 加入 PE-Cy5 标记的小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体、R-PE 标记的小鼠抗大鼠 CD8a 单克隆抗体(均按试剂说明书操作), 流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

取 100 μL 细胞悬液, 加入膜联蛋白 V-FITC 和 20 μg/mL PI 溶液进行处理, 具体操作按试剂说明书进行。处理结束后用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.6 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件行 *t* 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 T 淋巴细胞亚群变化

与假伤组大鼠比较, 烫伤组伤后 2、24、72 h CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比均明显下降(*t* 值分别为 3.87、10.30、11.90, *P* 值均小于 0.01), 伤后 72 h 达低谷; CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比均高于假伤组(*t* 值分别为 2.41、2.89、2.87, *P* 值均小于 0.05)。烫伤组伤后 24、72 h CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显低于假伤组(*t* 值分别为 13.09、17.15, *P* 值均为 0.000), 72 h 时达低谷。见表 1。

表 1 2 组大鼠肠系膜淋巴结 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 比值
假伤组	10	55.4 ± 1.2	24.6 ± 0.7	2.25 ± 0.03
烫伤组				
伤后 2 h	10	53.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	25.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.07
伤后 24 h	10	50.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	25.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.05 <sup>b</sup>
伤后 72 h	10	49.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	25.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.04 <sup>b</sup>

注:与假伤组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01

2.2 细胞凋亡情况

假伤组大鼠 MLN 细胞凋亡率为 (8.6 ± 0.6)%, 烫伤组伤后 2 h 为 (16.5 ± 0.8)%, 24 h 为 (23.0 ± 0.6)%, 72 h 为 (27.5 ± 1.0)%, 均明显高于假伤组 (*F* = 12.19, *P* < 0.05)。

3 讨论

人 T 淋巴细胞受体 αβ<sup>+</sup> T 淋巴细胞可以分为 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 2 个亚群, 两者相互作用, 分别发挥正、负调节作用。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值正常代表整体免疫平衡, 其降低则反映机体易感性增加。MLN 是肠道的主要引流淋巴结, MLN 相关指标的变化反映肠道区域淋巴循环状态的改变。本实验结

果表明, 严重烫伤大鼠 MLN CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比下降, 伤后 72 h 尤为明显; 但 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比各时相点均升高, 与 Calvano 等<sup>[3]</sup> 对 10 例患者的临床观察结果相似。国内报道, 严重烧伤患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比不同程度升高, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显下降, 说明患者免疫功能出现不同程度抑制, 致使自体细胞免疫调节网络呈现抑制性优势, 最终导致各种感染、多器官功能不全或死亡; CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值与血清可溶性 IL-2 受体表达呈负相关<sup>[4]</sup>, 且 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值变化与烧伤面积具有相关性<sup>[5]</sup>。

以往通常采用原位缺口末端标记 (TUNEL) 法检测细胞凋亡, 该法存在的不足是坏死细胞亦呈现阳性反应, 特异性较低<sup>[6]</sup>。使用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 双参数法检测, 可将正常细胞、凋亡细胞、死亡细胞区分开, 其凋亡检出率更有特异性; 细胞发生凋亡时, 膜上磷脂酰丝氨酸外露早于 DNA 断裂发生, 因此膜联蛋白 V-FITC 和 PI 双参数法检测早期凋亡优于 TUNEL 法及单纯 PI 法。本研究结果显示, 大鼠烫伤后 MLN 细胞凋亡率持续升高, 72 h 达高峰; 而夏培元等<sup>[7]</sup> 用 TUNEL 法测得大鼠烫伤后 3 h 细胞凋亡达峰值, 随后逐渐下降。此 2 项研究结果不一致的原因可能为: 本实验对大鼠行剖腹术制作淋巴瘘模型, 并在下腔静脉置引流管, 手术本身即是一种创伤; 相比 TUNEL 法而言, 膜联蛋白 V-FITC 和 PI 双参数法检测早期凋亡更加敏感。烫伤组大鼠细胞凋亡变化趋势与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比变化情况相反, 提示细胞凋亡、坏死的失衡可能是造成机体抗感染能力降低的原因, 但具体机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 范骏, 谢勇, 周南进, 等. 小肠集合淋巴结细胞凋亡对严重烫伤小鼠肠道免疫屏障的影响. 中华烧伤杂志, 2006, 22(4): 254-257.
- [2] 王年云, 李国辉. 可控喷水烫伤大鼠体表模型的制作. 中华烧伤杂志, 2006, 22(5): 387-388.
- [3] Calvano SE, deRiesthal HF, Marano MA, et al. The decrease in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells following thermal injury in humans can be accounted for by a concomitant decrease in suppressor-inducer CD4<sup>+</sup> T cells as assessed using anti-CD45R. Clin Immunol Immunopathol, 1988, 47(2): 164-173.
- [4] 游浩元, 詹剑华, 严济, 等. 严重烧伤患者外周血 T 细胞亚群 NK 细胞与血清 sIL-2R 的相关性研究. 实用临床医学, 2005, 6(4): 10-12.
- [5] 戴金华, 张淳. 动态检测烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群结果分析. 中国实验诊断学, 2006, 10(3): 289-290.
- [6] Huang X, Halicka HD, Traganos F, et al. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. Cell Prolif, 2005, 38(4): 223-243.
- [7] 夏培元, 郑江, 周红, 等. 烫伤大鼠肠内毒素移位对淋巴细胞凋亡的影响. 中华烧伤杂志, 2001, 17(4): 228-230.

(收稿日期: 2010-05-19)

(本文编辑: 罗勤)