

表 1 两组患者血浆 t-PA、PAI 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(h)				
		2	12	24	36	48
A 组	14					
t-PA(U/ml)		0.45 ± 0.18	0.35 ± 0.04	0.31 ± 0.14	0.32 ± 0.09	0.30 ± 0.11
PAI(AU/ml)		9.94 ± 1.95	10.12 ± 1.85	10.33 ± 0.14	9.91 ± 1.20	9.71 ± 0.74
B 组	18					
t-PA(U/ml)		0.51 ± 0.11	0.47 ± 0.18*	0.51 ± 0.22#	0.56 ± 0.21#	0.58 ± 0.13#
PAI(AU/ml)		9.98 ± 2.02	8.77 ± 2.31#	8.12 ± 1.89#	7.60 ± 0.21#	5.98 ± 0.05#

注: A 组为 2000 年 6 月—2001 年 12 月收治的患者, B 组为 2002 年 1 月—2004 年 10 月收治的患者; 血浆 t-PA、PAI 正常值分别为 (0.65 ± 0.21)、(4.97 ± 2.66) AU/ml; 与 A 组比较, * P < 0.05, # P < 0.01

表 2 两组患者动脉血 PaO₂ 及氧合指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伤后时间(h)				
		2	12	24	36	48
A 组	14					
PaO ₂ (kPa)		7.3 ± 2.0	7.6 ± 1.9	8.1 ± 1.2	8.5 ± 1.4	8.5 ± 1.9
氧合指数		30.6 ± 1.2	29.4 ± 2.1	30.5 ± 2.3	30.7 ± 1.7	30.9 ± 1.6
B 组	18					
PaO ₂ (kPa)		7.5 ± 1.7	8.8 ± 1.6	8.6 ± 1.3*	9.2 ± 1.7*	10.0 ± 2.1#
氧合指数		30.8 ± 1.5	31.9 ± 2.0*	32.2 ± 1.9*	33.8 ± 1.2#	35.4 ± 2.5#

注: A 组为 2000 年 6 月—2001 年 12 月收治的患者, B 组为 2002 年 1 月—2004 年 10 月收治的患者; 氧合指数、动脉血 PaO₂ 正常值分别为 >39.9、10.6 ~ 13.3 kPa (1 kPa = 7.5 mm Hg); 与 A 组比较, * P < 0.05, # P < 0.01

二、结果

1. 血浆 t-PA 和 PAI 活性: 伤后 12 h 开始, B 组 t-PA 活性均高于 A 组 (P < 0.05 或 0.01); 而 PAI 活性从伤后 12 h 开始较 A 组明显下降, 伤后 48 h 达低谷 (P < 0.01)。见表 1。

2. PaO₂ 及氧合指数: B 组伤后各时相点两指标均高于 A 组, 48 h 后达峰值。见表 2。

三、讨论

血浆 t-PA 和 PAI 是血管内皮细胞分泌的天然纤溶酶原激活剂, 在纤溶系统的活化过程中占有重要的地位。肺动脉内皮细胞比其他部位内皮细胞能分泌更多的 t-PA, 具有更显著的纤溶活性, 损伤后 t-PA 含量在肺挫伤局部增加, 影响更大^[3]。两者的检测能较全面地反映休克和肺挫伤的情况。李小兵等^[4]的观察表明, 患者 t-PA 与 PAI 变化趋势与其病情的严重程度呈正相关, 随着病情的变化而升降, 可作为预测病情和判断预后的一个指标。肺部 X 线片对肺挫伤的诊断存在一定局限性, 部分患者在创伤后 48 h 后才有表现^[5]。PaO₂、氧合指数、肺动脉楔压等虽能较准确地反映严重烧伤的休克情况, 但对肺损伤的程度反应不敏感。笔者在研究中观察到, B 组患者复苏液体量较 A 组少, 而胶体含量大, 血浆 t-PA 活性升高, PAI 活性降低, PaO₂ 和氧合指数均较好, 治疗效果满意。说明当患者休克期复苏满意时, 血浆 t-PA 活性逐

渐升高接近正常值, 而 PAI 活性值也逐渐下降接近正常值。这样的趋势可以指导抗休克的补液治疗。故在烧伤合并肺挫伤休克期患者复苏过程中行 t-PA 与 PAI 活性监测, 可解决大量补液及限制补液的矛盾。这样既纠正了烧伤后的低血容量性休克, 又避免了肺挫伤后因输液不当而加重肺损伤, 为临床治疗烧伤合并肺挫伤患者休克期补液提供了新的、较敏感的辅助监测手段。

参 考 文 献

- 1 廖克龙, 朱佩芳. 肺挫伤的研究与诊治. 中华创伤杂志, 2000, 16: 658 - 659.
- 2 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的临床研究. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 129 - 131.
- 3 张敬霞, 孙根义, 陈永利, 等. 组织型纤溶酶原激活物在急性肺血栓栓塞肺动脉组织中的表达. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 481 - 483.
- 4 李小兵, 吴胜群, 刘光晶. 烧伤病人血浆 t-PA 与 PAI 水平动态观察及临床意义. 中华综合医学, 2002, 3: 203 - 204.
- 5 Paul A, Bilstein MD, Gregory H. Computed tomography of the chest in blunt thoracic trauma: results of a prospective study. Trauma, 1999, 46: 833 - 838.

(收稿日期: 2005-09-26)

(本文编辑: 张红)

休克期大面积切痂对严重烫伤大鼠淋巴细胞亚群的影响

詹剑华 游浩元 严济 陶卫斌 李国辉 曾元临

基金项目: 江西省科委计划课题资助项目 (2002027)
作者单位: 330006 南昌大学第一附属医院烧伤科

感染是大面积烧伤患者常见的并发症之一, 其发生、发展及结局与机体的免疫状态密切相关^[1]。因此, 严重烧伤后

机体的免疫问题备受关注,许多学者在这方面做了大量的研究,但其确切的发生机制尚不清楚^[2]。为探讨烧伤后早期创面处理与机体免疫功能的关系,笔者观察了休克期切痂对烫伤大鼠淋巴细胞亚群的影响。

一、材料与方法

1. 动物模型及分组:将 70 只 Wistar 大鼠(南昌大学医学院实验动物部)随机分为休克期切痂组(30 只)、常规切痂组(30 只)、正常对照组(10 只)。除正常对照组不致伤外,其余两组大鼠参照文献^[1]造成背部 30% TBSA Ⅲ度烫伤(经病理切片证实),伤后依 Parkland 公式复苏。休克期切痂组伤后 6 h、常规切痂组伤后 4 d 切痂,切痂后创面以辐照氟银猪皮覆盖,并于伤后 1、5、9 d 处死大鼠,每个时相点 10 只。正常对照组于假伤后 1 d 处死。各组大鼠处死后均取其静脉血及脾脏待测。

2. 观察指标及检测方法:(1)取大鼠静脉血,用流式细胞仪(美国 BD 公司),采用直接荧光法检测大鼠 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤(NK)细胞活性、CD25⁺ 淋巴细胞。(2)取大鼠脾脏,制成淋巴细胞活性大于 95% 的单细胞悬液,加入含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,稀释成 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 的单细胞悬液。加入 6 孔培养板,并加入伴刀豆蛋白 A(Con A,美国 Sigma 公司),使其终浓度为 4 mg/L,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中孵育 48 h^[2],用流式细胞仪检测脾脏 CD25⁺ 淋巴细胞。

3. 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析及 *q* 检验。

二、结果

1. 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的变化:与正常对照组比较,各致伤组大鼠 CD3 细胞变化不大($P > 0.05$)。但伤后 1 d CD4、CD4/CD8 细胞明显减少,CD8 细胞明显增多($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 1。

表 1 3 组大鼠静脉血 T 淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
正常对照组	10	0.68 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.216 ± 0.017	2.29 ± 0.30
休克期切痂组	30				
伤后 1 d		0.70 ± 0.06	0.42 ± 0.05 [*]	0.263 ± 0.029 [#]	1.59 ± 0.19 [*]
伤后 5 d		0.64 ± 0.05	0.42 ± 0.04 ^{*Δ}	0.242 ± 0.011 ^{*Δ}	1.74 ± 0.17 ^{*☆}
伤后 9 d		0.67 ± 0.06	0.44 ± 0.04 ^Δ	0.250 ± 0.031 ^Δ	1.82 ± 0.26 ^{*☆}
常规切痂组	30				
伤后 1 d		0.66 ± 0.06	0.39 ± 0.05 [#]	0.250 ± 0.017 [*]	1.61 ± 0.20 [*]
伤后 5 d		0.65 ± 0.07	0.35 ± 0.04 [*]	0.286 ± 0.029 [*]	1.27 ± 0.10 [*]
伤后 9 d		0.66 ± 0.06	0.35 ± 0.05 [#]	0.291 ± 0.026 [#]	1.21 ± 0.16 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与常规切痂组比较,Δ $P < 0.05$,☆ $P < 0.01$

2. 大鼠 NK 细胞活性和 CD25⁺ 淋巴细胞的变化:两致伤组大鼠伤后各时相点静脉血 NK 细胞活性均低于正常对照组(12.8 ± 1.9)%。休克期切痂组伤后 1 d 为(9.5 ± 1.6)% ,明显低于正常对照组($P < 0.01$)。而常规切痂组伤

后 9 d 最低,为(7.2 ± 1.2)% ,与正常对照组及休克期切痂组(10.2 ± 1.6)% 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。两致伤组伤后各时相点静脉血及脾脏 CD25⁺ 淋巴细胞均低于正常对照组($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 2。

表 2 3 组大鼠 CD25⁺ 淋巴细胞的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	静脉血 CD25 ⁺	脾脏 CD25 ⁺
正常对照组	10	0.157 0 ± 0.002 7	0.354 3 ± 0.044 7
休克期切痂组	30		
伤后 1 d		0.009 2 ± 0.001 5 [*]	0.226 7 ± 0.027 7 ^{*Δ}
伤后 5 d		0.011 2 ± 0.002 1 ^{*Δ}	0.247 1 ± 0.049 5 ^{*☆}
伤后 9 d		0.011 7 ± 0.002 2 ^{*☆}	0.269 1 ± 0.053 0 ^{*☆}
常规切痂组	30		
伤后 1 d		0.009 2 ± 0.001 4 [#]	0.184 4 ± 0.023 9 [#]
伤后 5 d		0.008 0 ± 0.001 3 [#]	0.159 5 ± 0.027 6 [#]
伤后 9 d		0.006 8 ± 0.001 0 [#]	0.134 9 ± 0.035 1 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$, $P < 0.01$;与常规切痂组比较,Δ $P < 0.05$;☆ $P < 0.01$

三、讨论

T 淋巴细胞是具有特殊标志的从胸腺中输出的细胞,执行细胞免疫效应功能及免疫调节功能。其中 CD4 和 CD8 是一对相互制约的 T 淋巴细胞亚群,其比值已成为监测人体细胞免疫功能、反映机体免疫状态的重要指标。NK 细胞是机体抗肿瘤、抗感染的重要免疫细胞,构成了机体清除非己细胞的第一道防线^[3,4]。

本研究结果表明,休克期切痂组及常规切痂组大鼠 CD4、CD4/CD8 及 NK 细胞活性均明显低于正常对照组,而 CD8 细胞则较正常对照组高,提示大鼠烫伤后机体 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞活性发生了明显的改变。这种改变的结果导致机体对外来抗原的识别能力下降,免疫应答受抑,清除非己细胞的能力下降。伤后 5 ~ 9 d 休克期切痂组 CD4、CD4/CD8 及 NK 细胞活性明显较常规切痂组高,而 CD8 则较常规切痂组低。说明休克期切痂可改善严重烫伤大鼠 T 淋巴细胞亚群分布,增强 NK 细胞活性,有利于机体免疫功能的恢复。

T 淋巴细胞静止状态不能产生细胞因子,只有经活化后才能发挥其作用。CD25⁺ 是 T 淋巴细胞活化的重要标志^[5],其表达水平高低直接与细胞免疫功能有关。本实验结果表明,大鼠烫伤后不但 T 淋巴细胞亚群结构发生了变化,而且其活性也明显降低,休克期切痂则有利于 T 淋巴细胞活性的恢复。各烫伤组大鼠伤后脾淋巴细胞经 Con A 活化后,CD25⁺ 淋巴细胞表达明显低于正常对照组。说明烫伤使机体 T 淋巴细胞在非特异性刺激下活化、增殖、转化的能力受到了明显抑制。休克期切痂在一定程度上改善了烫伤后 T 淋巴细胞的这种状态,有利于机体免疫功能的恢复^[6,7]。故休克期切痂可以明显改善烫伤大鼠 T 淋巴细胞亚群的分布,提高 NK 细胞活性、T 淋巴细胞增殖及转化能力,促进 T 淋巴细胞活性的恢复,对烫伤大鼠免疫功能紊乱有一定的调理作用。

参 考 文 献

1 Bontham P, Chandran P, Rowlands B, et al. Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications. *Surgeon*, 2003, 1: 187 - 206.

2 詹剑华,李光金,李国辉,等. CD3AK 细胞提高烧伤患者细胞免疫功能的研究. 中华烧伤杂志,2001,17:159-162.

3 苗明三,主编. 实验动物和动物实验技术. 北京:中国中医药出版社,1997. 335.

4 陈光星,刘清平,黄青春,等. 通痹灵对于 IL-2 及其受体 α 链影响的体内外研究. 上海免疫学杂志,2003,23:184-186,189.

5 Han TH, Lee SY, Kwon JE, et al. The limited immunomodulatory effects of escharectomy on the kinetics of endotoxin, cytokines, and adhesion molecules in major burns. Mediators Inflamm,2004,13:241-

246.

6 Jordan S. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. Microb Infect,2002,4:1545-1558.

7 程晋,田增爵. SLE 患者 AMLR 与 T 细胞 Ia 抗原的改变及意义. 免疫学杂志,1994,10:37-39.

(收稿日期:2005-09-30)

(本文编辑:张红)

转化生长因子 β_1 II 型受体 CA 重复序列基因在人正常皮肤和瘢痕疙瘩中的表达

樊树强 蔡景龙 安纲

瘢痕疙瘩的生物学特性类似于肿瘤。最近研究表明,转化生长因子 β_1 II 型受体 (transforming growth factor- β_1 receptor II, T β R II) 是一种新的抑癌基因,而肿瘤细胞中最常见的是该基因表达异常^[1]。本研究主要是通过改变 T β R II 基因突变的热点 CA 重复序列,以检测瘢痕疙瘩成纤维细胞是否存在与肿瘤细胞同样的基因突变。

一、资料与方法

1. 主要试剂和仪器:蛋白酶 K(上海博亚生物技术有限公司),Taq 酶和琼脂糖(北京拜尔迪生物技术公司),PCR 仪(美国 MJ Research 公司,PTC-200 型),ABI 3730 型自动测序仪(美国应用生物系统公司)。

2. 标本收集及细胞培养:瘢痕疙瘩组织标本取自笔者单位需行整形术的患者 20 例,其中男 8 例、女 12 例,年龄 5~62 岁[(28±10)岁],瘢痕形成时间为 3~26 年[(8±4)年]。所选试验对象均符合病程超过 2 年、病变超过损伤范围并具有持续生长及痛痒等临床特征,已经病理学科确诊。正常皮肤组织标本取自手术剩余皮肤,分别为乳房缩小术胸前壁 3 例、重睑术上睑 3 例、包皮环切术包皮 1 例及腹壁整形术腹壁 1 例,其中男 3 例、女 5 例,年龄 8~52 岁[(29±8)岁]。收集上述标本(患者均知情同意)进行常规成纤维细胞培养。

3. 引物的设计与合成:按常规酚-三氯甲烷法提取成纤维细胞 DNA,根据 GeneBank 上人类 T β R II cDNA 序列^[2],在 CA 重复序列(1 931~1 936)位点两侧使用 Premier 3.0 软件设计上游引物:5'-TTTGGATCTCTTCCCGCTA-3',下游引物:5'-CTCCAGCTCACTGAAGCGTT-3',扩增产物长度为 120.0 bp。

4. PCR 及单链构象多态性(SSCP)分析:PCR 体系:模板 DNA(100 g/L)2 μ l,PCR 缓冲液 5 μ l, Mg²⁺(25 mmol/L)1.5 μ l,三磷酸脱氧核(糖核)苷(dNTP,10 mmol/L)2 μ l,引物浓度均为 30 μ mol/L,体积 0.83 μ l,Taq 酶(5 U/ μ l)0.4 μ l,加双蒸水至反应体积为 50 μ l,加样过程中置于冰块上以防止 Taq 酶变性。离心后放入 PCR 仪。将获得的产物进行 10 g/L

琼脂糖凝胶水平电泳和 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。凝胶银盐液染色,行 SSCP 分析后采用捷达 JD801 专业数码凝胶成像分析系统 3.3(江苏省捷达软件工程有限公司)判断有无基因突变。条带位置泳动异常者为 SSCP 阳性。

5. PCR 产物的测序:将 PCR 产物纯化后,在 ABI 3730 型自动测序仪上测序,鉴定基因突变位点和类型,并采用 Chromas 软件(上海英骏生物技术有限公司)查看所得基因图谱。

二、结果

1. 瘢痕疙瘩组织标本 CA 重复序列位点中有 1 块 SSCP 阳性,表现为泳动速度快、迁移率高(第 5 泳道),DNA 大小和迁移率分别为 118.6 bp、61%;其他瘢痕疙瘩 DNA 大小为 119.8、120.0 bp,迁移率均为 62%。正常皮肤组织标本 DNA 为 120.0 bp,其迁移率为 62%。见图 1。



图 1 SSCP 分析显示瘢痕疙瘩组织标本 CA 重复序列位点有 1 块泳动异常。marker 为 pUC19;1,2,4,5,6 泳道为瘢痕疙瘩;3 泳道为正常皮肤

2. 瘢痕疙瘩和正常皮肤组织标本成纤维细胞的 T β R II CA 重复序列基因测序未检出异常,测序图谱与 GeneBank 同一位点的基因组序列一致。见图 2,3。



图 2 正常皮肤组织 CA 重复序列与 GeneBank 中登记的序列一致



图 3 瘢痕疙瘩组织 CA 重复序列未见异常,与正常皮肤组织一致

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271348)

作者单位:250033 济南,山东大学医学院附属第二医院美容整形烧伤中心

通信(讯)作者:蔡景龙, Email: caijinglong@126.com, 电话: 0531-85875079