



## 材料与 方法

1. 主要试剂及仪器: KC 无血清培养液 K-SFM 购自美国 Gibco 公司; 乙二胺四乙酸 (EDTA)、dispace 酶及 DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司; 鼠抗人角蛋白单克隆抗体购自德国 Chemicon 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG1 购自北京中山生物技术有限公司; 550 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

2. HKC 的原代及传代培养: 取 5 ~ 10 岁儿童及 20 ~ 30 岁成人环切术后包皮 (患者及家属均知情同意) 各 5 例, 分为儿童组和成人组。将所取标本剪成  $10 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$  皮片, 置于  $2.5 \text{ g/L}$  dispase 液中  $4^\circ\text{C}$  消化 16 ~ 18 h, 剥离表皮置于  $2.5 \text{ g/L}$  胰蛋白酶与  $0.2 \text{ g/L}$  EDTA 混合液 (体积比为 1:1) 中,  $37^\circ\text{C}$  消化 5 min, 终止消化后吹打、过滤, 离心后收集细胞, 加入含牛垂体提取物 (BPE) 的 K-SFM, 将 HKC 按  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  接种, 每 2 ~ 3 天更换培养液 1 次。待细胞 70% ~ 80% 融合时传代, 弃去培养液, 每个培养皿加 2 ~ 3 ml 上述混合消化液,  $37^\circ\text{C}$  消化 1 min 后弃去消化液, 以残留的消化液继续消化 5 ~ 8 min。倒置显微镜下见细胞收缩变圆, 侧倾培养皿见细胞呈流沙样下潜时以 DMEM 终止消化, 离心洗涤 2 次, 细胞以 K-SFM 重悬, 按 1:2 或 1:3 传代。

3. 检测指标: (1) 原代 HKC 获得数: 将各标本分离得到的 HKC 数除以标本面积即得。(2) 形态学观察: 以台盼蓝法染色, 倒置显微镜下观察 HKC 增殖过程及特点。(3) HKC 的鉴定: 细胞爬片后用丙酮固定, 以 1:200 鼠抗人角蛋白单克隆抗体为一抗, 以 1:25 FITC 标记的羊抗鼠 IgG1 为二抗, 阴性对照以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗, 常规免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察。(4) HKC 生长速度: 将原代及各代 HKC 以相同密度接种于 6 孔板中, 记录各代 HKC 达 70% 融合时所需时间。(5) 用噻唑蓝 (MTT) 法检测 HKC 细胞生长曲线: 取处于对数生长期的 HKC, 按文献 [1] 方法检测其生长曲线。(6) 细胞周期检测: 取处于对数生长期的 HKC, 用流式细胞仪测定细胞周期。

4. 统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Excel 软件处理,  $t$  检验。

## 结 果

1. 原代 HKC 获得数: 儿童组原代 HKC 获得数为  $(1.780 \pm 0.010) \times 10^6/\text{cm}^2$ , 较成人组的  $(1.490 \pm$

$0.120) \times 10^6/\text{cm}^2$  高, 两组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2. 两组 HKC 形态学观察: 刚分离的 HKC 为透亮的小圆形细胞, 台盼蓝染色约 94% 细胞拒染, 接种 2 h 后可见少许细胞开始贴壁, 呈多边形或三角形, 接种 24 h 后约 70% 细胞贴壁, 48 h 后细胞开始增殖并形成散在小片, 3 ~ 5 d 后细胞可达 70% 融合, 呈铺路石样, HKC 的纯度达 99% 以上, 未见人成纤维细胞 (Fib), 见图 1。多次传代的 HKC 贴壁速度、贴壁率及透亮度明显增加; 接种 1 h 后即有 50% 左右细胞贴壁, 接种 24 h 后所有细胞均已贴壁。自第 8 代开始, 出现体积巨大的细胞, 并可见膜化现象 (图 2)。



图 1 HKC 接种 3~5 d 后细胞融合成片, 呈铺路石样, 未见成纤维细胞。倒置显微镜  $\times 100$

Fig 1 Slabstone-like HKCs conjugated 3 to 5 days after passage. IM  $\times 100$



图 2 第八代 HKC 中出现体积巨大的细胞, 有膜化现象。倒置显微镜  $\times 100$

Fig 2 Giant cells with membrane-like cells was observed among HKCs of the eighth generation. IM  $\times 100$

3. HKC 鉴定: 荧光显微镜下见细胞胞浆呈强黄绿色, 细胞核未着色, 结合形态特点, 证明其为 HKC (图 3)。



图 3 荧光染色见 HKC 胞浆着色, 细胞核未着色。荧光显微镜  $\times 400$

Fig 3 Fluorescence was observed in the cytoplasm but not nuclei of HKCs. FM  $\times 400$



- of inflammation. Lancet, 1991, 337: 211 - 214.
- 4 青春, 曹颖平, 史济湘, 等. 自体皮混合移植成活机制中角质形成细胞及细胞因子作用的实验研究. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 336 - 339.
- 5 谷廷敏, 孙志刚, 牛星焘, 等. 创面愈合过程中表皮生长因子及其受体变化的临床研究. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 52 - 53.

- 6 马翠玲, 李志强, 李春英, 等. 胰蛋白酶预处理在人角质形成细胞传代培养中的应用. 第四军医大学学报, 2001, 22: 177.
- 7 宓惠茹. 表皮细胞培养移植与烧伤创面修复. 北京医学, 2002, 24: 203 - 205.

(收稿日期: 2005 - 03 - 10)

(本文编辑: 张 红)

## · 病例报告 ·

## 严重烧伤后右股动脉感染致假性动脉瘤一例

徐国士 王野 朱志军 池一凡

患者男, 42 岁, 汽油火焰烧伤, 总面积 90%, 其中浅 II 度 80%、深 II 度 2%、III 度 8% TBSA。伤后 1 h 收入笔者单位。入院前曾在本院急诊科经右侧腹股沟处正常皮肤抽取右股动脉血行血气分析检查, 同时在该处行右侧股静脉穿刺置管(进管 17 cm), 入院后经抗休克、抗感染、营养支持等综合治疗, 患者平稳度过休克期。1 周后拔除静脉导管, 拭子培养结果为多重耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)感染。伤后 14 d 患者 80% TBSA 创面愈合, 但右股静脉穿刺部位出现红肿伴疼痛, 体温升高。局部给予 50 g/L 硫酸镁湿敷, 全身应用抗生素, 但效果不佳。伤后 21 d, 患者右股静脉穿刺部位红肿明显, 有搏动感, 给予局部切开引流, 引出暗红色脓液约 15 ml, 并用凡士林油纱布填塞。2 d 后换药, 患者局部疼痛未减轻, 体温在 39.0℃ 左右。伤后 25 d 查白细胞  $20.1 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞 0.84, 局部 B 超结果提示: 右侧股动脉假性动脉瘤(直径 4 cm)。当日在氯胺酮麻醉下, 行右侧腹股沟探查术, 术中见右股动脉前壁距右髂外动脉 10 cm 处有一处约 1.5 cm × 0.8 cm 破损, 周围有 1 个 4 cm × 4 cm × 4 cm 炎性腔隙, 其内有少量暗红色脓液。清创, 取右侧股动脉前壁破损处组织活检并做细菌培养和药物敏感试验, 结果显示 MRSA 感染。先后用体积分数 3% 过氧化氢、0.5 g/L 洗必泰、0.5 g/L 新霉素溶液反复冲洗术区局部腔隙, 剪开腹膜, 暂时阻断右侧髂总动脉, 截取同侧大隐静脉近心端约 2 cm, 纵行剖开形成 2 cm × 1 cm 的静脉组织片, 用 9-0 无损伤尼龙线连续缝合修补右侧股动脉前壁破损处。35 min 后松开右髂总动脉阻断钳, 经检查右股动脉修补处无渗漏, 右足动脉搏动良好, 逐层缝合切口, 置橡皮管引流。术后患者应用万古霉素和美洛培南抗感染, 每日输血浆、红细胞和白蛋白, 并加强肠内营养。术后 3 d 患者仍高烧不退, 切口周围红肿, 右下肢肿胀。再次行 B 超检查示右股动脉通畅, 右股静脉部分受阻, 切口皮下有积液。遂予以部分拆线敞开切口, 引出脓液约 20 ml, 以碘仿纱条换药, 患者体温仍波动在 38.5 ~ 39.5℃。术后第 6 天下午, 患者右股切口处突然涌出鲜血约 1 500 ml, 测血压为 80/50 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 立即用无菌纱布加压包扎后在氯胺酮麻醉下行急诊手术探查, 见右股动脉补片上下约 5 cm 处均有炎性浸润, 补片近心端裂开, 动脉前壁破溃约 1.0 cm × 0.5 cm。阻断右髂总动脉, 取直径 1.0 cm 人造血管 12 cm, 行人造血管与髂外动脉和股动脉端侧吻合搭桥术, 上端血管吻合处用腹膜覆盖, 下端血管吻合处用有

生机的邻近肌肉瓣覆盖。清除右股动脉坏死部分并缝扎, 冲洗并检查有无漏血, 待右足背动脉搏动良好, 缝合切口并放置负压引流管。术后第 1 个 24 h 引流出淡红色血性液体约 50 ml, 第 2 个 24 h 引出约 10 ml, 第 3 天引出约 1 ~ 2 ml。拔除负压引流管, 患者体温呈弛张热。第 4 天将右股切口大部分缝线拆除, 敞开切口中段, 并用碘仿纱条覆盖暴露的人造血管, 换药 2 ~ 3 次/d。由于渗液较多, 多次细菌培养均为 MRSA, 因此血管搭桥术后仍给予万古霉素和美洛培南抗感染, 并增加口服氟康唑预防真菌感染。第 5 天开始患者体温恢复到 37.0 ~ 38.0℃, 停止全身应用抗生素, 加强换药。右股切口逐渐缩小, 部分肉芽组织生长并覆盖包绕人造血管。于搭桥术后 29 d 在硬膜外麻醉下转移右股切口外侧双蒂皮瓣(18 cm × 10 cm)修复右股创口, 1 周后拆线, 10 d 后患者出院。1 年后随访, 患者右下肢功能恢复良好。

讨论 大面积烧伤后并发静脉感染以前曾有报道<sup>[1]</sup>, 并发大动脉感染甚至破裂大出血者较为罕见<sup>[2,3]</sup>。结合本例的治疗情况, 笔者有以下几点体会: (1) 静脉穿刺和抽取血标本时, 必须严格无菌操作, 尽可能不经过创面穿刺血管, 以免引起局部和血管壁感染。(2) 抽取动脉血标本后, 应立即压迫穿刺部位不少于 5 min, 防止局部形成血肿而为感染留下隐患。本例患者入院前有右股动、静脉穿刺史, 不排除局部出血和继发感染的可能。(3) 修补破裂的动脉壁时, 应在无菌环境和有生机的组织间进行, 如局部已经感染, 应取一块血运良好、抗感染能力强的带蒂肌肉组织瓣覆盖修补的动脉血管壁, 同时感染部位充分引流, 才能提高手术成功率。

为了挽救患者生命和保留其肢体, 在感染区行人造血管搭桥术是不得已而为之, 笔者认为手术成功的要点如下: (1) 血管搭桥上、下吻合口处用健康、血运良好的组织瓣有效覆盖。(2) 右股切口处及时敞开, 有效地引流并针对性使用抗生素, 控制了感染的发展。(3) 术后加强营养支持, 迅速提高患者血浆蛋白水平, 增强了免疫力, 有利于控制感染和促进创面愈合。

## 参 考 文 献

- 1 徐国士, 袁家德, 朱志军, 等. 严重烧伤并发导管败血症 18 例临床分析. 中华医院感染学杂志, 2002, 12: 36 - 37.
- 2 王莉, 李辉, 董延江. 经股动脉、静脉穿刺插管并发假性动脉瘤 2 例. 实用放射学杂志, 1997, 13: 695 - 696.
- 3 蒙树岳, 庄小强, 胡日焕, 等. 人造血管修复股动脉假性动脉瘤 2 例. 广西医科大学学报, 1999, 16: 392.

(收稿日期: 2005 - 04 - 19)

(本文编辑: 赵 敏)

作者单位: 266011 青岛市立医院烧伤整形科(徐国士、王野、朱志军), 心脏外科(池一凡)