

• 临床检验研究 •

重型肝炎患者血浆置换治疗前后凝血功能变化的研究

陈 志,陈 江,逯心敏,郭 渝
(四川省宜宾市第二人民医院检验科 644000)

摘 要:**目的** 观察重型肝炎患者采用血浆置换治疗前后凝血功能的变化情况。**方法** 46 例重型肝病患者在综合治疗的基础上经血浆置换,通过观察凝血功能的变化,判断分析血浆置换治疗重型肝炎的临床疗效。**结果** 经血浆置换治疗后凝血酶原时间(PT)、部分凝血酶原激活时间(APTT)、凝血酶原凝固时间(TT)均有不同程度的缩短($P<0.05$),纤维蛋白原(Fib)无显著改变($P>0.05$)。**结论** 在综合治疗的基础上血浆置换是治疗重型肝病一种有效的手段。

关键词:血浆置换; 肝病; 凝血功能
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.018 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)09-0961-01

The change of blood coagulant function for hepatitis patients treated by plasma exchange

Chen Zhi, Chen Jiang, Lu Xinmin, Guo Yu
(Department of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract:**Objective** To explore the effects of blood coagulant function on fulminant hepatitis patients treated by plasma exchange. **Methods** 46 fulminant hepatitis patients were treated by plasma exchange based on multi-modality treatment. To examine the change of blood coagulant function, the clinical efficacy of fulminant hepatitis patients was evaluated. **Results** After plasma exchange treatment, prothrombin time, activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) was reduced in various degree. **Conclusion** Plasma exchange based on multi-modality treatment was an effective therapy method for fulminant hepatitis.

Key words: plasma exchange; liver diseases; blood coagulant function

重型肝病多是病毒性肝炎,多是因长期大量酗酒、服用肝损害药物或生物性、化学性因素导致的肝坏死、肝功能衰竭,其并发症复杂、病情凶险、预后极差,死亡率高达 60%~80%,是临床上常见的危重病症之一。本院于 2002 年开始应用血浆置换治疗各种原因导致的重型肝病取得了较好的疗效^[1]。本研究对重型肝炎患者人工肝治疗前后凝血功能变化进行了观察,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 46 例重型肝病患者均为本院住院患者,诊断符合 2000 年西安全国传染病与寄生虫病学术会议修订的标准^[2],其中男 30 例,女 16 例,年龄 29~68 岁。急性重型肝炎 4 例、亚急性重型肝炎 10 例、慢性重型肝炎 32 例。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 所有重型肝炎患者均给予肝细胞生长素、胸腺肽、清蛋白、新鲜冰冻血浆等综合治疗,同时进行血浆置换治疗,每次治疗前先用双针建立静脉通道,每次置换血浆量 3 500~4 000 mL。血浆置换治疗间隙为每周 1 次。治疗后用鱼精蛋白中和肝素,选用仪器为德国贝朗 Dia Pact CBP 血浆交换仪。

1.2.2 实验室检查 所有患者均于人工肝治疗前后 24 h,在安静状态下,按标准取血样检测凝血功能和肝功能。采用德国 BE 公司生产的 BE-compact 全自动血凝仪及其配套试剂(包括

质控品)进行凝血功能的凝血酶原激活时间(PT)、部分凝血酶原时间(APTT)、国际标准化比率(INR)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原 Fib 分析。采用日本 7600 全自动生化分析仪和上海申能试剂对肝功能的各项指标总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬酸氨基转移酶(AST)、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)进行检测分析。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,数据间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 症状和体征变化情况 46 例患者经血浆置换治疗后,症状均有不同程度的改善,表现为食欲增加、乏力改善、腹胀减轻、意识转清,尿量增多等。

2.2 血浆置换治疗前后凝血和纤溶指标的变化情况 经血浆置换治疗后,PT、APTT、INR、TT 较治疗前明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。Fib 较治疗前变化不明显。结果见表 1。

表 1 血浆置换治疗前后各项凝血指标比较($\bar{x}\pm s, n=46$)

时间	PT(s)	INR	APTT(s)	Fib(g/L)	TT(s)
治疗前	23.2±8.50	2.31±0.29	61.5±10.20	2.20±0.45	24.5±4.40
治疗后	20.5±9.10	1.54±0.31	46.8±12.90	2.23±0.29	20.1±3.80
t 值	2.68	2.23	3.49	1.22	2.01
P 值	<0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05

表 2 血浆置换治疗前后肝功能指标比较($\bar{x}\pm s, n=46$)

时间	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
治疗前	223.2±8.5	138.6±12.4	187.2±16.4	201.2±14.2	57.6±6.4	29.5±6.4
治疗后	106.3±9.1	89.6±8.40	89.6±9.5	76.8±10.9	55.4±3.8	31.2±4.5
t 值	5.68	4.23	4.16	3.21	1.69	2.58
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05

3 讨 论

在蛋白研究方面,现国内多用细菌表达体系获得所需蛋白。当利用基因工程方法表达蛋白质时,除了考虑外源蛋白表达后的性质,还要考虑目的蛋白是否为胞外蛋白、表达量,以及有无简单易行的纯化方法对表达的蛋白质进行纯化以获得高纯度蛋白质。外源蛋白质的高效表达与表达系统、表达条件密切相关。

大肠杆菌表达系统是较为常用的一种。其优点是遗传背景比较清楚、表达水平较稳定、易操作、有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供选择,并且成本低、蛋白表达量高、容易纯化等。本实验从人外周血单核细胞中提取总 RNA,通过 PCR 得到了人胞外段 IL-1R I 基因,并将其插入原核表达质粒 pET32a(+),构建了重组表达载体 pET32a-IL-1R I。在重组质粒的构建过程中,本实验是通过化学法将 IL-1R I 和质粒连接反应液转化 DH5 α 感受态,感受态是本实验室通过 CaCl₂ 法制备获得,由于多种原因导致转化效率较低,将转化后菌液涂布到含抗生素平板上过夜培养后平板上只生长 5 个单菌落,挑取各个单菌落进行 PCR 检测后发现均有特异性条带,但是有 2 个单菌落的 PCR 产物条带在阳性对照的下方(结果未给出),其他 3 个单菌落的 PCR 产物条带位置正确。每个菌落均转制新鲜的 LB 液体培养基过夜培养后送广州英伟捷基公司测序,测序所用引物为自备 P1、P2。测序结果在 NCBI 网站上进行比对,发现 PCR 产物条带位置正确的菌中均含有与胞外段 IL-1R I 基因完全符合的序列,而 PCR 产物条带在阳性对照条带下方的菌中只含有部分胞外段 IL-1R I 基因,可能是由于在转化过程中质粒发生基因缺失的突变所致。挑取阳性菌落至 5 mL 新鲜 LB 液体培养基过夜培养,第 2 天提取质粒。由于不能确定回收后质粒浓度,所以在进行表达菌株转化的时候分别取回收后质粒 2、5、8 μ L 进行转化。B21(DE3)感受态是本实验室通过 CaCl₂ 法制得。转化完成后置掌上离心机上离心 2 min 后弃去部分上清,留 200 μ L 上清于管底用移液枪轻柔混匀后涂布平板过夜培养。发现加 2 μ L 质粒进行转化所涂布平板和加 5 μ L 质粒进行转化所涂布平板长满单菌落,8 μ L 质粒进行转化所涂布平板无菌落生长。原因可能是 8 μ L 中质粒含量过高对感受态存在毒害作用,导致转化效率降低。在两个长菌的平板上分别挑取 8 个单菌落进行 PCR 鉴定,PCR 结果均有特异性条带并且位置正确。取其中 1 个单菌落

转至新鲜 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养,第 2 天送广州英伟捷基公司测序。测序结果在 NCBI 网站进行比对后发现所测菌中含有与胞外段 IL-1R I 基因完全符合的序列。对测序正确单菌落进行 IPTG 诱导,成功在大肠杆菌中表达出了人胞外段 IL-1R I 蛋白,该重组蛋白主要以包涵体形式存在。对工程菌表达条件进行了初步的优化,结果显示,IPTG 浓度(0.5~2.0 mmol/L)对胞外段 IL-1R I 蛋白表达量的改变无明显影响,而 1 h 之后随着诱导时间的延长蛋白表达量并无上升趋势。

该研究结果为进一步获得人 IL-1R I 重组蛋白,并研究其结构、功能活性和抗体制备等奠定了一定的实验基础。

参考文献

[1] Dinarello CA. The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases[J]. Infect Agents Dis,1992,1(5):227-236.
[2] Hunter CA,Chizzonite R,Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens[J]. J Immunol,1995,155(9):4347-4354.
[3] Guzeldemir E, Gunhan M, Ozcelik O, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis[J]. J Oral Sci,2008,50(2):151-159.
[4] Loddick SA,Liu C,Takao T, et al. Interleukin-1 receptors:cloning studies and role in central nervous system disorders[J]. Brain Res Brain Res Rev,1998,26(2/3):306-319.
[5] Sumathi S,Christine S,Charles C. The interleukin 1 receptor family[J]. Dev Comp Immunol,2004,28(5):415-428.
[6] 黄宪章,王前,郑磊,等. 类风湿性关节炎患者外周血 IL-1R I 水平的变化[J]. 广东医学,2008,29(2):233-234.
[7] Holder AL,Wolf S,Walshe C, et al. Expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 is determined by genotype:effects on efficiency of leukocyte adhesion to human endothelial cells[J]. Hum Immunol,2008,69(2):71-78.

(收稿日期:2011-02-11)

(上接第 961 页)

2.3 血浆置换治疗前后患者肝功能的影响 经血浆置换治疗后肝功能明显改善,TBIL、DBIL 下降明显($P<0.01$),ALT、AST 下降明显($P<0.01$),ALB 明显上升。结果见表 2。

3 讨 论

重型肝炎的发生是多种因素共同作用的结果,多数患者有明显的出血症状,若救治不及时极容易导致死亡^[3],因此即时补充凝血因子,改善患者凝血机制是危急症重型肝炎患者治疗的有效方法。血浆置换疗法作为新的治疗手段,不仅可以清除中分子的毒性物质(氨、假神经递质、胆红素、内毒素、炎性细胞因子)、减轻肝内炎症,同时还补充了血浆清蛋白和凝血因子,解决低血压及水电解质紊乱,减轻患者的出血及水肿,改善肝脏生存的内环境,促进肝细胞再生和肝功能恢复^[4]。

本研究结果显示,46 例患者经 3~4 次血浆置换后,肝功能及凝血功能明显提高,临床症状大大缓解。表明人工肝疗法可有效减轻肝脏负担,改善机体凝血功能,对重型肝炎疗效满意,是一种有效的肝脏替代疗法。

参考文献

[1] Montejo Gonzalez JC,Catalan Gonzalez M,Meneu Diaz JC, et al. Artificial liver support system in acute liver failure patients waiting liver transplantation[J]. Hepatogastroenterology,2009,56(90):456-461.
[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志,2000,8(6):324-329.
[3] Takahashi K,Umeshara Y,Umeshara M, et al. Plasma exchange-based plasma recycling dialysis system as an artificial liver support[J]. Ther Apher Dial,2008,12(4):264-270.
[4] Inoue K,Kourin A,Watanabe T, et al. Artificial liver support system using large buffer volumes removes significant glutamine and is an ideal bridge to liver transplantation[J]. Transplant Proc,2009,41(1):259-261.

(收稿日期:2011-02-19)