

• 临床免疫学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

以菌蛻作为 DNA 载体构建双重靶向乳腺癌基因疫苗

田曙光¹, 靳小潘², 陈建魁¹, 于 农¹, 宋世平¹, 季守平²

(1. 军事医学科学院附属医院, 北京 100071; 2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

摘要:目的 以菌蛻(BG)作为 DNA 载体, 构建具有内源性和外源性双重靶向的乳腺癌基因疫苗。方法 将裂解质粒 pHH43 转化入大肠埃希菌(*E. coli*)DH5 α , 经温控诱导裂解基因-E 的表达后, 裂解细胞壁, 制备细菌 BG; 将 HER2/NEU 中免疫原性多肽 E75 基因片段连接到带有小鼠恒定链(mLi)的真核表达载体 pDSRed-mLi 中, 构建内源性靶向 DNA 疫苗 pDSRed-mLi-E75; 再将构建好的 DNA 疫苗装载到 *E. coli* BG 中。结果 经温控诱导裂解基因-E 的表达后可将细菌细胞壁裂解, 形成中空的 *E. coli* BG; 通过基因重组技术构建了 DNA 疫苗 pDSRed-mLi-E75, 并将其装载到 BG 中。结论 通过裂解基因-E 的表达可制备 *E. coli* BG, 后者具有装载 DNA 的功能。本研究以 BG 装载 pDSRed-mLi-E75, 制备了具有双重靶向的乳腺癌疫苗, 其功能还需细胞转染试验和动物试验来证实。

关键词: 乳腺肿瘤; 菌蛻; 鬼影细胞; 基因疫苗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)20-2478-04

乳腺癌是影响女性健康甚至危及生命最常见的恶性肿瘤之一, 目前世界乳腺癌患者已超过 120 万, 每年约 33 万妇女死于乳腺癌^[1]。研究发现 25%~30% 乳腺癌患者 HER2/NEU 呈阳性, HER2/NEU 基因与细胞分化、迁移、肿瘤侵袭、局部及远处转移、新血管生成和抑制细胞凋亡密切相关^[2]。以 HER2/NEU 为靶点的乳腺癌治疗方法及药物相关研究取得了很大进展, 为乳腺癌的预防和治疗带来更大的希望。例如帕妥珠单抗可以与 HER2 的 ECD II 区结合, 抑制 HER2 二聚体的形成及受体介导的信号转导通路, 对晚期乳腺癌疗效, 现已进入 III 期临床试验^[3]。拉帕替尼则是一种活性酪氨酸激酶抑制剂, 是 HER1 与 HER2/NEU 的靶向治疗药物, 不但对曲妥珠有效的 HER2/NEU 阳性乳腺癌有效, 而且对曲妥珠耐药的 HER2/NEU 阳性乳腺癌也显示出治疗活性^[4-5]。Peoples 等^[6]以 HER2/NEU 免疫原性多肽 E75(369-377; KIFGSLAFL)作疫苗, 采用 GM-CSF 作为免疫佐剂, I 期和 II 期临床试验证实能显著减少高危乳腺癌的复发, 具有很好的开发前景。细菌菌蛻(BG)是将细菌裂解细胞壁、去除菌体内容物之后形成的细菌空腔。BG 有可能成为 DNA 疫苗运送的新型载体。由于 BG 保留了完整细菌所有的抗原特性, 宿主免疫识别细胞(主要是 DC)将 BG 作为“危险的入侵者”, 从而主动识别并将其吞噬, 因而 BG 能够以类似于自然感染的方式靶向性进入 DC^[7-9]。以 BG 作为载体, 装载乳腺癌 DNA 疫苗, 在增强疫苗免疫应答水平, 提高疫苗效率上将是一种全新的尝试。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希菌(*E. coli*)DH5 α 、BL21 感受态为北京博迈德科技发展有限公司产品; pHH43 质粒为德国 Rainer Hass 教授惠赠; pQE31-mLi 质粒由德国 Bischof Felix 教授馈赠; pDSred-N1 质粒为 BD Clontech 公司产品; 质粒小量抽提试剂盒为威格拉斯生物技术有限公司产品; Gel Doc2000 凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司; 激光扫描共聚焦显微镜购自德国 LEICA 公司; 2K15 型低温离心机购自美国 Sigma 公司; ASV3020 型高压灭菌装置购自日本 SAKURA 公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠埃希菌 BG 的制备 (1)质粒 pHH43 的转化: 取 1 μ L pHH43 质粒加入到 100 μ L *E. coli* DH5 α 感受态中, 冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s, 取出后冰浴 2 min, 加入 500 μ L 不含抗菌药物的 LB 培养基, 摇床(温度 28 $^{\circ}$ C、转速 90 r/min)

培养 1 h。取 100 μ L 菌液涂布在含氯霉素(30 mg/L)的 LB 平板上, 倒置, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜。(2)阳性克隆的筛选与鉴定: 在平板上挑取单克隆菌落, 接种于 5 mL 含氯霉素 CatGC 的 LB 培养基中, 摇床(温度 28 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min)培养过夜。收集菌液提取质粒, 利用 Sac I 内切酶对质粒进行酶切鉴定。Sac I 内切酶可将质粒 pHH43 切成 2 个大小分别为 50 500、1 435 bp 左右的片段。(3)*E. coli* DH5 α BG 的制备: 将阳性菌落接种于 5 mL 含氯霉素 CatGC 的 LB 培养基中, 摇床(温度 28 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min)培养过夜。再将其转种于 50 mL 含氯霉素 CatGC 的 LB 培养基中, 摇床(温度 28 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min)培养至 OD₆₀₀ 约为 1.5 时, 4 $^{\circ}$ C、6 000 $\times$ g 离心 10 min 后收集菌体, 用 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次。将菌液放入 42 $^{\circ}$ C 摇床中, 诱导细菌裂解 30 min, 超声破碎, 285 000 $\times$ g 离心 60 min, 沉淀重悬在 Tris 醋酸盐缓冲液中, -70 $^{\circ}$ C 保存。(4)琼脂糖电泳和激光共聚焦观察: 将诱导 4 h 左右的菌液 6 000 $\times$ g 离心 10 min, PBS 重悬, 加入适量 DNase I (3.3 μ g/mL), 充分混匀后静置 1 h, 收集上清液, PBS 和无菌水交替洗涤 3 次, 取出适量用于琼脂糖电泳鉴定; 同时取过夜培养的普通 DH5 α 菌液破碎裂解后, 取等量用于电泳, 作为阴性对照。其余菌液加入适量 MitoTracker 染料, 37 $^{\circ}$ C 染色 15 min, 用于激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.2.2 真核表达载体 pDSred-mLi 的构建 (1)小鼠恒定链(mLi)序列的扩增: 以 pQE31-mLi 质粒为模板, 根据待扩增的小鼠恒定链(mLi)序列在质粒 pQE31-mLi 上的位置设计引物, 上游引物 5'端引入 Xho I 酶切位点, 下游引物 5'端引入 EcoR I 酶切位点。引物由 Invitrogen 公司合成。P1: 5'-GCG CTC GAG ATG ACG GAT CCG CAT GCG AGC T-3'; P2: 5'-CGC GAA TTC GCA GGG TGA CTT GAC CCA G-3'。50 μ L PCR 扩增反应体系含高保真 DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L、10 $\times$ 缓冲液 5 μ L、dNTP(2.5 mmol/L) 4 μ L、pQE31-mLi 质粒 1 μ L、P1(20 μ mol/ μ L) 1 μ L、P2(20 μ mol/ μ L) 1 μ L、H₂O 36.25 μ L, 混匀后低速离心。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, 循环 35 次。反应完毕后取 5 μ L 反应产物, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。(2)质粒 pDSRed-N1 和 PCR 产物的酶切 利用限制性内切酶 Xho I、EcoR I 对质粒 pDSRed-N1 和含 mLi 序列的 PCR 产物进行酶切, 反应体系均为 50 μ L, pDSRed-N1 酶切体系中质粒 pDSRed-N1 15 μ L、Xho I 2.3 μ L、EcoR I 2.3 μ L、10 $\times$ H 缓冲液 5 μ L、H₂O 25.4

μL ;PCR 产物酶切体系中 PCR 产物 $15\ \mu\text{L}$ 、Xho I $2.3\ \mu\text{L}$ 、EcoR I $2.3\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{H}$ 缓冲液 $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O $25.4\ \mu\text{L}$; $4\ ^\circ\text{C}$ 酶切过夜。利用 DNA 片段回收试剂盒对酶切产物进行回收和纯化。(3) PCR 产物与 pDSRed-N1 载体的连接:利用 T4 DNA 连接酶将酶切后的产物进行连接,反应体系总体积 $10\ \mu\text{L}$, $10\times\text{T4}$ 连接缓冲液 $1\ \mu\text{L}$ 、T4 DNA 连接酶 $1\ \mu\text{L}$ 、pDSred-N1 载体 $1\ \mu\text{L}$ 、PCR 产物 $3\ \mu\text{L}$ 、 H_2O $4\ \mu\text{L}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 连接过夜。(4) 连接产物的转化:取 $5\ \mu\text{L}$ 连接产物加入 $50\ \mu\text{L}$ DH5 α 感受态菌液中,冰浴 $30\ \text{min}$,同时设置阴性对照(感受态菌液中不加入外源 DNA); $42\ ^\circ\text{C}$ 水浴热休克 $90\ \text{s}$,冰浴 $2\ \text{min}$ 。EP 管中加入 $500\ \mu\text{L}$ 不含抗菌药物的 LB 培养基,摇床(温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 、转速 $90\ \text{r/min}$)培养 $1\ \text{h}$ 。涂布于含卡那霉素($50\ \text{mg/L}$)LB 平板上,倒置, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养过夜。(5)真核表达载体 pDSred-mLi 的筛选和鉴定:转化次日观察平板菌落生长情况,阴性对照平板上应无菌落长出,挑取试验组平板上单克隆菌落接种于 $5\ \text{mL}$ LB 培养基(含卡那霉素)中,摇床(温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 、转速 $200\ \text{r/min}$)培养过夜,第 2 天提取质粒,部分送交博迈德公司测序,剩下部分分装并于 $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.3 内源性靶向乳腺癌基因疫苗 pDSred-mLi-E75 的构建

(1)HER2/NEU 免疫原性多肽 E75 基因序列的合成:参考 GenBank 中 NM004448 基因序列,E75 基因序列为 aag atc ttt ggg acc tgg cat ttc tg。将 E75 基因序列替换 mLi 序列中 CLIP 片段(见图 1),并在上游 $5'$ 端引入 Xho I 酶切位点,下游 $3'$ 端引入 Acl I 酶切位点,总长 $69\ \text{bp}$ 。该序列交由北京博迈德科技发展有限公司合成。抗原表位序列为: $5'$ ctc gag ATG ACG GAT CCG CAT GCG AGC TCG GTA CCC CAG CTT CCG AAA TCT GCC AAA CCG GTG AGC CAG aag atc ttt ggg acc tgg cat ttc tgC GGC CGA TGT CCA TGG ATA ACA TGC TCC TTG GGC CTG TGA AGA ACG TT3'。(2)质粒 pDSred-mLi 和合成序列的酶切:利用限制性内切酶 Xho I、Acl I 对质粒 pDSred-mLi 和含 mLi 序列的合成序列进行酶切,反应体系均为 $50\ \mu\text{L}$,pDSred-mLi 酶切体系中质粒 pDSred-mLi $15\ \mu\text{L}$ 、Xho I $2.3\ \mu\text{L}$ 、Acl I $2.3\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{H}$ 缓冲液 $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O $25.4\ \mu\text{L}$;含 mLi 序列的合成序列中合成序列 $15\ \mu\text{L}$ 、Xho I $2.3\ \mu\text{L}$ 、Acl I $2.3\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{H}$ 缓冲液 $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O $25.4\ \mu\text{L}$; $4\ ^\circ\text{C}$ 酶切过夜。利用 DNA 片段回收试剂盒对酶切产物进行回收和纯化。(3)质粒 pDSred-mLi 和含 mLi 序列的合成序列的连接与转化:利用 T4 DNA 连接酶将酶切后的产物进行连接,总体积 $10\ \mu\text{L}$, $10\times\text{T4}$ 连接缓冲液 $1\ \mu\text{L}$ 、T4 DNA 连接酶 $1\ \mu\text{L}$ 、酶切后 pDSred-N1 载体 $1\ \mu\text{L}$ 、酶切后合成序列 $3\ \mu\text{L}$ 、 H_2O $4\ \mu\text{L}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 连接过夜。取 $5\ \mu\text{L}$ 连接产物加入 $50\ \mu\text{L}$ DH5 α 感受态菌液中,冰浴 $30\ \text{min}$,同时设置阴性对照(感受态菌液中不加入外源 DNA), $42\ ^\circ\text{C}$ 水浴热休克 $90\ \text{s}$,冰浴 $2\ \text{min}$ 。EP 管中加入 $500\ \mu\text{L}$ 不含抗菌药物的 LB 培养基,摇床(温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 、转速 $90\ \text{r/min}$)培养 $1\ \text{h}$ 。涂布于含卡那霉素($50\ \text{mg/L}$)LB 平板上,倒置, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养过夜。(5)真核表达载体 pDSred-mLi-E75 的筛选和鉴定:转化次日观察平板菌落生长情况,阴性对照平板上应无菌落长出,挑取试验组平板上单克隆菌落接种于 $5\ \text{mL}$ LB 培养基(含卡那霉素)中,摇床(温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 、转速 $200\ \text{r/min}$)培养过夜,第 2 天提取质粒,部分送交博迈德公司测序,剩下部分分装并于 $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存。将提取的质粒用 Xho I、EcoR I 进行酶切后, 1.0% 琼脂糖电泳查看酶切结果。挑选在理论位置有相应条带的质粒送交博迈德公司测序。

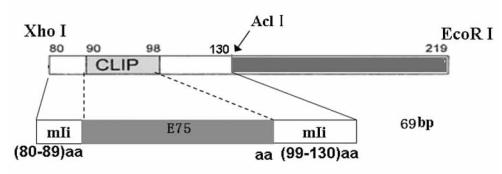
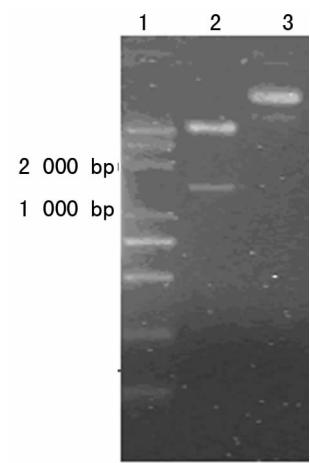


图 1 HER2/NEU(E75)抗原表位构建设计图

2 结果

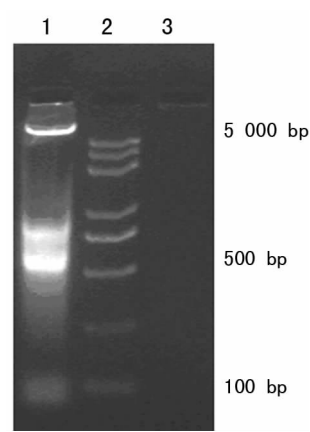
2.1 质粒 pHH43 的转化 提取的质粒用 Sac I 酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见在 $1\ 000$ 、 $2\ 000\ \text{bp}$ 间有明显条带,与 pHH43 理论大小($1\ 435\ \text{bp}$)一致,见图 2。



1. DNA 分子标记物(DL2000);2. 酶切后的 pHH43 质粒;3. 未酶切的 pHH43 质粒。

图 2 pHH43 经 sac I 酶切电泳图

2.2 大肠埃希菌 DH5 α BG 的制备与鉴定 BG 制备完成,将溶液经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可以观察到未经裂解的细菌组有明显的、大小不一的 DNA 条带,这是细菌本身基因组 DNA;而制备完成的 BG 组则看不到 DNA 条带,提示 BG 内核酸已被释放出来,并经洗涤后去除,见图 3。在激光扫描共聚焦显微镜下,MitoTracker 染色后 BG 呈绿色,可见裂解后的菌体呈现中空形态,并具备完整的膜结构,表明细菌裂解成功,见图 4。

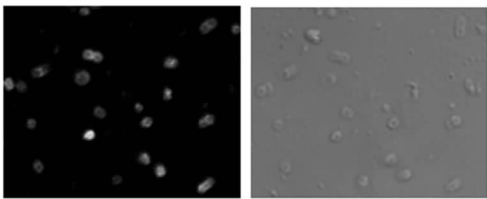


1. 裂解后的大肠埃希菌;2. DNA 分子标记物(DL2000);3. BG 组。

图 3 裂解后的细菌及 BG 的 DNA 琼脂糖电泳图

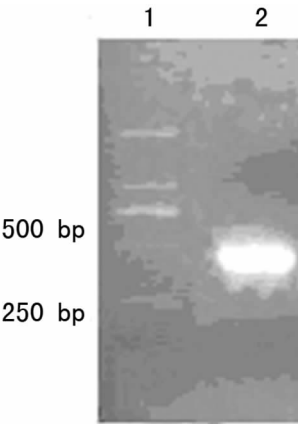
2.3 真核表达载体 pDSred-mLi 的构建 利用设计的引物对质粒 pQE31-mLi 进行 PCR,PCR 产物见图 5,可见 $500\ \text{bp}$ 左右有清晰条带,证实 PCR 获得了目的片段。测序结果与理论

一致。



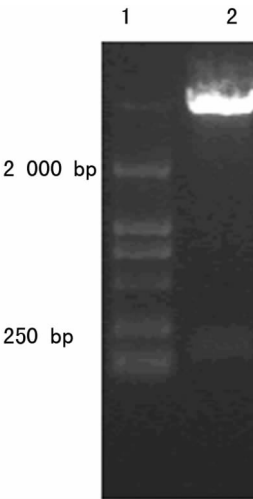
左图: MitoTracker 染色; 右图: 普通光镜。

图 4 激光扫描共聚焦显微镜观察裂解后细菌的形态 (×1 000)



1. DNA 分子标记物 (DL2000); 2. PCR 产物。
图 5 PCR 获得 mLi 序列

2.4 内源性靶向乳腺癌基因疫苗 pDSred-mLi-E75 的构建经抗原表位鉴定, E75 多肽的基因序列长 27 bp, 而 mLi 序列去除 CLIP 片段后的大小应为 117 bp, 因此双酶切后片段大小应为 144 bp, 见图 6。测序结果与理论一致, 证明成功构建 pD-Sred-mLi-E75 表达载体。



1. DNA 分子标记物 (DL2000); 2. pDSred-mLi/E75 酶切片段。
图 6 pDSred-mLi/E75 酶切电泳图

3 讨 论

3.1 通过将裂解质粒 pHH43 转化入 E. coli DH5α, 经温控诱导裂解基因-E 的表达后, 裂解菌壁, 经过反复洗涤获得了细菌 BG。在激光扫描共聚焦显微镜下, 可见裂解后的菌体呈现中空形态, 并具备完整的膜结构, 表明细菌裂解成功。琼脂糖电泳结果显示经裂解洗涤后, BG 中检测不到 DNA 条带, 提示细菌内核酸都已释放出来, 经几次洗涤后被去除^[10]。

3.2 BG 周质腔内膜和外膜相互链接形成完整的细胞膜结构, 可用于装载质粒 DNA。同时 BG 还能够被宿主 DC 识别、吞噬, 靶向性将 DNA 疫苗导入 DC 细胞, 这一结构使以 BG 装载的 DNA 疫苗具有外源性靶向作用, 大大地增强 DNA 疫苗的免疫活性, 提高免疫应答^[11]。

3.3 研究表明 MHC-II 的分子伴侣恒定链 (Ii) 在抗原提呈通路中发挥重要作用^[12]。MHC-II 在与多肽结合之前, 抗原结合槽始终被 Ii 的 CLIP 占据。在构建 pDSred-mLi-E75 基因疫苗时, 将 E75 基因序列替换 mLi 序列中 CLIP 片段, 免疫后就能够让 E75 抗原表位靶向性地进入 MHC II 的抗原结合槽, 直接将表达的抗原提呈给效应细胞, 从而大大提高抗原提呈效率, 即具备了内源性靶向作用^[13]。

3.4 I、II 期临床试验结果显示, 以 E75 作疫苗能显著降低采用传统方法治疗的乳腺癌患者的疾病复发率, 并能维持持续免疫反应, 毒性极小, 有望用作新型安全有效的辅助治疗, 协助现有标准疗法, 降低乳腺癌复发率^[6]。本研究将 HER2/NEU 免疫原性多肽 E75 基因序列构建乳腺癌 DNA 疫苗, 希望在 Peoples 等^[6]的研究基础上构建疗效更好的乳腺癌疫苗。

3.5 要检验构建的乳腺癌基因疫苗的实际免疫效果, 尚需细胞转染和动物免疫试验来验证, 即通过体内和体外试验验证疫苗的双重靶向性作用。这将在后续试验中完成。

参考文献

[1] Wong NS, Anderson BO, Khoo KS, et al. Breast cancer in developing countries[J]. Lancet, 2009, 374(9701): 1567-1573.
[2] Moasser MM. Targeting the function of the HER2/NEU oncogene in human cancer the rapeutics[J]. Oncogene, 2007, 26(46): 6577-6582.
[3] Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2 positive breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(34): 5838-5844.
[4] Lin NU, Dirras V, Paul D, et al. Muhicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2/NEU positive breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1452-1456.
[5] Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first line treatment form etastatic breast cancer [J]. Clin Oncol, 2008, 26(34): 5544-5549.
[6] Peoples GE, Holmes JP, Hueman MT, et al. Combined clinical trial results of a HER2/NEU/neu(E75) vaccine for the prevention of recurrence in high risk breast cancer patients; U. S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I and II [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(3): 797-802.
[7] Ebensen T. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines[J]. J Immunol, 2004, 172(23): 6858-6865.
[8] Panthel K, Jechlinger W, Matis A, et al. Generation of Helicobacter pylori ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates[J]. Infect Immun, 2003, 71(1): 109-116.
[9] WHO. Escherichia coli O157: H7 outbreak in spinach. World Health Organization, International Food Safety Authorities Network (INFOSAN). INFOSAN Information Note No. 1[R]. Geneva, Swiss: WHO, 2007.
[10] 靳小攀, 檀英霞, 李素波, 等. 大肠杆菌菌膜作为核酸疫苗载体的实验方法研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(2): 171-175.

[11] 靳小攀,季守平. 细菌鬼影在核酸疫苗研究中的作用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(7): 92-96.

[12] Bancherea J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(5): 767-774.

[13] Nagata T. Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II

• 临床免疫学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

binding peptide/CLIP-replace invariant chain(Ii) induces specific help-
er T cells in vivo; the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles
for immunization[J]. Vaccine, 2002, 20(1): 105-114.

(收稿日期: 2012-08-09)

烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达与炎症标志的分析

杨 勇, 董长林, 陈 琪, 袁 梅

(浙江省武警医院检验科, 浙江嘉兴 314000)

摘 要:目的 探讨烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达以及炎症标志指标的相关变化。方法 根据烧伤面积程度将烧伤患者分为重度烧伤组和轻度灼伤组(包括电击伤、烫伤), 对照组为体检健康者。采用流式细胞仪的单克隆抗体分析细胞免疫指标[CD3、CD4、CD8、CD19、自然杀伤细胞(NK 细胞)], 采用散射比浊法分析炎症因子指标[C 反应蛋白(CRP)、 α -酸性糖蛋白(AAG)、结合珠蛋白(HP)、铜蓝蛋白(CER)], 观察细胞免疫指标(CD3、CD4、CD8、CD19、NK 细胞)和炎症因子指标(CRP、AAG、HP、CER)的变化。**结果** 重度烧伤患者的各项免疫指标与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 而轻度灼伤患者各项免疫指标无明显异常。重度烧伤组 CRP、AAG、HP、CER 和轻度灼伤组 HP、CER、HP 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 外周血 T 淋巴细胞亚群表达以及炎症标志指标检测对临床烧伤患者的诊断、治疗和病情监测至关重要。

关键词: 烧伤; T 淋巴细胞亚群; 炎症; 细胞因子; C 反应蛋白

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 20. 020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)20-2481-02

全身炎症反应综合征(SIRS)为各种感染和非感染损伤引发机体全身炎症, 是大面积烧伤常见的并发症, 在危重烧伤患者中发病率很高^[1]。外周血 T 淋巴细胞亚群表达的 CD4/CD8 明显下降可导致 SIRS, 最终引发多器官功能受损乃至死亡^[2]。目前尚无关于烧伤后患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达以及 SIRS 炎症标志诸如 C-反应蛋白(CRP)、 α -酸性糖蛋白(AAG)、结合珠蛋白(HP)、铜蓝蛋白(CER)相关变化的临床报道。为探讨患者烧伤后外周血 T 淋巴细胞亚群表达以及与炎症标志指标的相关变化, 积极有效地掌握烧伤患者病情发展, 进行有效治疗, 本研究采用流式细胞术及免疫比浊法分析 40 例本院不同程度烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群及其与几种主要炎症因子的关系, 结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2010 年 12 月本院烧伤整形科收治的烧伤患者(烧伤组)40 例, 男 27 例、女 13 例, 年龄 6~68 岁; 所选患者烧伤前均为健康者, 无肝炎、自身免疫性疾病或慢性炎症病史等。同期于本院体检健康者(对照组)30 例, 均为血液、B 超、放射检验结果正常者。所有血清标本均保存于 -20℃, 每季度检测炎症指标 1 次, 全血标本则当日检测。根据烧伤面积程度将烧伤患者分为重度烧伤组和轻度灼伤组(包括电击伤、烫伤), 其中超过 90% 的重度烧伤患者烧伤面积大于 80% 且为 II~III 度重度烧伤(该类型烧伤是外科救治的难点, 病程长、并发症多且凶险、死亡率高^[3]), 轻度灼伤组损伤面积为 2%~10%。

1.2 仪器与试剂 流式细胞分析试剂由美国 INVITROGEN 公司生产, 杭州联科生物技术有限公司提供, 仪器为德国制造的 PARTEC 流式细胞仪, 型号为 PAS; 炎症因子检测试剂由美国 BECKMAN COULTER 公司生产, 上海华美伦生物技术有限公司提供, 仪器为美国 BECKMAN COULTER 公司制造的 IMAGE 800 特定蛋白分析仪。

1.3 方法 流式细胞仪的单克隆抗体分析细胞免疫指标包括白细胞分化抗原 CD3、CD4、CD8、CD19 及自然杀伤细胞(NK 细

胞); 散射比浊法分析炎症因子指标, 包括 CRP、AAG、HP、CER。

1.4 统计学处理 采用 Excel2003 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均值比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 与对照组比较, 重度烧伤烧伤患者的各项免疫指标出现明显异常, 其中 CD3、CD4、CD4/CD8、CD8、NK 细胞比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而轻度灼伤组各项免疫指标无明显异常, 见表 1。

表 1 不同烧伤组与对照组间细胞免疫功能结果比较

项目	组别		
	对照组	轻度灼伤组	重度烧伤组
CD3	70.3±8.9	67.6±10.0	48.2±11.6 *
CD4	40.8±9.4	38.7±7.2	25.9±12.8 *
CD8	26.8±5.5	26.4±6.9	37.6±15.9 *
NK 细胞	16.9±4.8	15.9±5.1	13.6±9.5 *
CD4/CD8	1.5±0.5	1.4±0.5	0.9±0.5 *

*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 在各项炎症指标中, 重度烧伤组 CRP、AAG、HP、CER 和轻度灼伤组 CRP、HP、CER 水平与对照组间存在统计学差异($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 不同烧伤组与对照组间炎症指标结果比较

项目	组别		
	对照组	轻度灼伤组	重度烧伤组
CRP	0.5±0.4 *	2.5±1.4	13.6±4.8 *
AAG	103.9±48.6	113.7±46.4	210.8±51.3 *
HP	89.7±32.5	178.2±53.9 *	256.7±65.2 *
CER	32.4±13.8	24.3±8.1 *	26.4±7.8 *

*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨 论

烧伤患者体内存在免疫功能紊乱, 其中细胞免疫功能下降