

[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)、 $\alpha$ -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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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)、 $\alpha$ -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<sup>[3]</sup>), 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

是导致严重烧伤后并发全身性感染、多器官功能受损及患者死亡的重要原因之一<sup>[4]</sup>。全面观察烧伤后患者,特别是重度烧伤患者,细胞免疫功能的变化,对了解烧伤后机体免疫状况,探索免疫功能紊乱的发生机制,以及免疫功能紊乱的治疗及病情监测有一定的临床价值。

T 淋巴细胞主要执行细胞免疫的效应功能及免疫调节功能。本文表 1 显示:重度烧伤患者外周血 CD3 细胞比例较健康者明显下降,说明重度烧伤患者细胞免疫功能处于抑制状态。CD4 细胞和 CD8 细胞是参与细胞免疫调节的一对相互制约的 T 淋巴细胞亚群;CD4 细胞为辅助/诱导 T 细胞亚群,可协调 B 细胞分化抗体,CD8 细胞为抑制/细胞毒 T 细胞亚群,可抑制抗体的合成、分泌及 T 细胞的增殖,二者的稳态维持着机体的免疫应答。重度烧伤患者外周血 CD4 细胞比例明显低于健康者,CD8 细胞比例则高于健康者,CD4/CD8 比值明显低于健康者,说明重度烧伤患者机体的免疫稳态遭到破坏,正是这种稳态的破坏,导致烧伤患者机体发生免疫功能紊乱,进而并发全身感染和器官损伤。轻度灼伤患者各项免疫指标则无显著变化。免疫指标的变化可反映患者病情的严重程度。因此,检测烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群的表达,对了解烧伤患者,特别是重度烧伤患者机体免疫功能,控制病情发展起到至关重要的意义。

另一方面,烧伤后患者机体的炎性反应本质上是对烧伤所致组织损伤的一种防御反应,有助于清除创面坏死组织,限制组织损伤的扩大,并加速组织的修复。本文表 2 显示:重度烧伤患者 CRP、AAG、HP 水平较健康者明显升高,而 CER 较健康者降低( $P<0.05$ );轻度灼伤患者 CRP、HP 较健康者升高,而 CER 较正常者降低( $P<0.05$ ),AAG 则无明显变化。重度烧伤患者 CRP、AAG 较轻度灼伤患者明显升高( $P<0.05$ ),说

明炎症因子指标 CRP、AAG 可以反映烧伤患者机体的炎症损伤及其严重程度。由于烧伤越重、病程越长,全身性感染发病率越高<sup>[5]</sup>,而且过激的炎症应激性反应,往往导致 SIRS 的发生以及对组织器官的直接损伤,积极有效维持机体抵抗力成为治愈重度烧伤的关键,对烧伤患者尽早行炎症因子指标检测非常必要。

综上所述,烧伤患者机体不仅存在细胞免疫功能的低下,而且也呈现炎性反应的增强;如何调节提高烧伤患者,尤其是重症烧伤患者机体的细胞免疫功能和控制过激的炎症应激性反应,防止烧伤患者的全身性感染以及器官损伤,对烧伤患者行外周血淋巴细胞亚群和炎症因子指标检测有助于临床烧伤患者的诊断、治疗和病情监测。

## 参考文献

- [1] 孙东明,程亚颖,井丽娟,等. 全身炎症反应综合征患儿血内毒素、脂多糖结合蛋白/脂多糖受体水平变化的意义[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(6):426-427.
- [2] 黎鳌. 烧伤治疗学[M]. 2 版,北京:人民卫生出版社,1995:80.
- [3] Bak Z, Berg F, Eriksson O, et al. Hemodynamic changes during resuscitation after burns using the Parkland formula[J]. J Trauma, 2009,66(2):329-336.
- [4] Housbrough JF, Zopatel Sirveel RL, Paterson VM. Immunomodulation following burn injury[J]. Surg Clin Nor Am, 1987,67(1):69-72.
- [5] Edward RS, Toliver K. Mechanisms of the inflammatory response [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2004,18(3):385-405.

(收稿日期:2012-08-09)

# 类风湿关节炎患者血清瓜氨酸化蛋白差异表达分析

高德玉, 刘 阳, 王 凯, 虞伟, 严孝岭, 陈芳芳, 李晓军

(解放军南京总医院全军临床检验医学研究所, 江苏南京 210002)

**摘要:**目的 血清抗环瓜氨酸化蛋白抗体(抗 CCP 抗体)检测对类风湿关节炎(RA)诊断具有高度的敏感性及特异性,是一种 RA 早期诊断指标。尽管抗体已被发现多年,但是其所针对的天然靶抗原仍不十分清楚。本试验通过合成兔抗 CCP 抗体免疫亲和层析柱,提取 RA 患者及健康人血清中瓜氨酸化相关抗原,并通过蛋白质组学技术对提取的具有差异性的瓜氨酸化蛋白进行鉴定。**方法** 抗 CCP 抗体阳性血清取自 2010 年 12 月至 2011 年 7 月本院门诊及住院 RA 患者,正常血清取自健康献血者及体检者。体外人工合成 CCP 肽(HQCHQESTXGRSRGRCGRSGS),制备并纯化兔抗 CCP 多克隆抗体。将纯化的兔抗 CCP 抗体与高流速 NHs-活化琼脂糖偶联制作免疫亲和柱,提取 RA 患者抗 CCP 抗体阳性血清及正常血清中的瓜氨酸化蛋白质,通过二维电泳将提取蛋白分离,分析并筛选二者有差异蛋白点,通过基质辅助激光解吸电离飞行质谱分析进行蛋白鉴定。**结果** 通过兔抗 CCP 抗体-高流速 NHs-活化琼脂糖免疫亲和层析纯化、二维电泳和基质辅助激光解吸电离飞行质谱分析,获得了差异性及重复性很好的差异蛋白图谱,将 RA 患者 ACCP 阳性血清和正常血清亲和层析提取蛋白 2-D 图谱比对发现,RA 提取蛋白二维凝胶电泳图谱中共 312 蛋白点,正常血清提取蛋白有 274 个蛋白点,其中有 166 个具有差异表达的蛋白点。在差异蛋白点中,有 101 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调,65 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达下调。52 个蛋白点 RA 患者血清提取蛋白中表达而在正常血清提取蛋白缺失,16 种蛋白在 RA 患者血清提取蛋白中表达而在正常血清提取蛋白缺失。挑选其中差异明显并且灰度值较高的 51 个点进行鉴定分析,并与 IPI 和 Swiss-Prot 数据库进行比对,共鉴定出多种可能与 RA 发病相关的蛋白。在选取的 51 个蛋白点中,有 30 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调,21 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达下调。**结论** 在 RA 患者与健康者血清蛋白中发现部分差异表达的瓜氨酸化蛋白,这些差异蛋白可能成为涉及 RA 发病机制的自身抗原,为进一步研究 RA 的发病机制奠定了基础。

**关键词:** 关节炎, 类风湿; 抗环瓜氨酸化蛋白抗体; 二维电泳; 质谱分析法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2482-04