论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2198-05

TAT-Smad7-HA 融合蛋白的表达及其转导活性验证

刘 波[1],张恒术[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院整形烧伤外科,[2]临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 构建、表达、纯化、鉴定并标记 TAT-Smad7-HA 融合蛋白,验证其在体外培养的人原代瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast cell,KFB)中的转导活性。**方法** 分别将 TAT-PTD、Smad7 基因和 HA 片段依次连接入 pET32a(+)质粒构建成 pTAT-Smad7-HA 重组原核表达载体,IPTG 诱导表达后经亲和纯化、Western blot 验证、肠激酶切割、目的片段回收和 FITC 标记后,将 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白作用于体外培养的人原代 KFB 以观察其转导活性。**结果** 成功构建了 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的原核表达载体 pTAT-Smad7-HA,目的蛋白在诱导后获得了高效表达(占菌体总蛋白的 25% 以上),并成功进行了纯化(纯度达 95% 以上)、脱盐柱脱盐、Western blot 验证、硫氧环蛋白切除及 FITC 标记,得到相对分子质量约为 50×10^3 的 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白,并进一步在体外培养的人 KFB 细胞中证实了其高转导活性。**结论** 本实验获得了高纯度的 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白,并验证了其在 KFB 中的高转导活性。

关键词: 原核表达;TAT 蛋白转导结构域;瘢痕疙瘩;人 Smad7 蛋白;TGF-β/Smad 信号通路

中图法分类号: R341; R394-33; R619.6 **文献标识码:** A

Expression of TAT-Smad7-HA fusion protein and validation of its transduction activity

LIU Bo[1], ZHANG Heng-shu[2] ([1]Department of Burn and Plastic Surgery, First Affiliated Hospital, [2]State Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct, express, purify, identify and label the TAT-Smad7-HA fusion protein (protein transduction domain of trans-activator, human Smad7 and hyaluronic acid) and to validate its transduction activity in the cultured human primary keloid fibroblast cells. **Methods** TAT-PTD, Smad7 and HA fragments were sequentially inserted into pET32a(+) to construct the pTAT-Smad7-HA prokaryotic expression vector. After the expression of target fusion protein was induced to express by IPTG, affinity purification, Western blot analysis, enterokinase cleavage, target protein capture and FITC labeling were subsequently performed by turns to obtain the FITC-TAT-Smad7-HA fusion protein and to further observe its transduction activity in the human primary KFB cells *in vitro*. **Results** The prokaryotic expression vector for the TAT-Smad7-HA fusion protein, named as pTAT-Smad7-HA was successfully constructed, and the target fusion protein was efficiently induced to express, covering more than 25% of the total bacterial proteins, successfully purified with a purity of more than 95% purity, desalted by desalting column, identified by Western blotting, thioredoxin removed and FITC labeled. Finally, a fusion protein of FITC-TAT-Smad7-HA with the approximately molecular weight of 50×10^3 was successfully purified and its high transduction activity in KFB cells was validated. **Conclusion** The highly-purified FITC-TAT-Smad7-HA fusion protein and the validation of its high transduction activity in KFB cells have provided an experimental foundation for further studies on the role the human Smad7 protein playing in the TGF-β/Smads signal transduction pathway and further elucidation of the pathogenesis of keloid formation.

Key words: prokaryotic expression; trans-activator protein transduction domain; keloid; human Smad7 protein; TGF-β/Smads signal transduction

作者简介: 刘 波,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事瘢痕疙瘩发病机制及治疗方面的研究。E-mail:fcz69@sina.com

通信作者: 张恒术,E-mail:drzhs@sina.com

收稿日期: 2008-01-20;**修回日期:** 2008-03-12

转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)在创伤愈合中具有至关重要的生物学效应,抑制 TGF-β 的活性可能会成为治疗瘢痕增生的有效途径[1]。近几年,对 TGF-β 细胞内信号转导分子—Smad 家族的发现和研究,为调控 TGF-β 信号转导通路提供了新的思路。Smad7 是一种抑灶制型 Smad(I-Smad),对 TGF-β 信号转导起着负性调节作用。文献[2,3]报道,通过增加外源性的 Smad7 能够改变瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast cell, KFB)的某些纤维化特性。近年来,蛋白质与多肽类药物相继出现,但由于生物膜的屏障作用,使许多具有治疗作用的外源性生物大分子难以在病灶达到有效浓度,从而给疾病的治疗造成困难。已经发现的一种来源于 HIV-1 病毒转录激活因子(trans-activator,TAT)含有 11 个氨基酸的蛋白转导结构域(protein transduction domain,PTD),能够有效引导蛋白肽穿透细胞膜而进入细胞内,TAT-PTD 的发现在蛋白功能和疾病治疗的研究中具有重要的应用价值[4]。

本实验成功构建 TAT-Smad7-HA 融合表达载体并诱导 TAT-Smad7-HA 融合蛋白表达,经亲和层析柱纯化、FITC 标记后,对其在体外培养的人原代 KFB 中的转导活性进行了验证,以期为进一步探讨 TAT- Smad7 融合肽对瘢痕疙瘩的防治和治疗作用奠定实验基础。

1　材料与方法

1.1　标本来源

实验中所用瘢痕疙瘩标本均取自本院外科手术治疗的患者,患者无明显创伤史,瘢痕疙瘩标本均经临床和病理确诊。共收集 5 例标本,其中男性 2 例,女性 3 例;部位分布:包皮 2 例,耳垂部 1 例,颈部和臀部各 1 例。标本的采集都征得患者的书面同意。

1.2　主要材料和试剂

pET32a 质粒、*E. coli* BL21(DE3)表达菌、肠激酶切割捕获试剂盒、His. Bind Colume 均为 Novagen 公司产品质粒,pcDNA3-mSmad7 由日本国立癌症研究基金会 Takeshi Imamura 博士惠赠;DH5α 由本室保存;*rTaq* DNA 聚合酶, PrimeStar DNA 聚合酶,限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ、*Eco*RⅠ、*Nco*Ⅰ,DNA 连接酶,胶回收试剂盒等均购于 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购于上海华瞬公司;蛋白纯化全套试剂均按照 Novagen 公司的 His 标签融合蛋白纯化操作手册配置;蛋白标准、兔多克隆抗-HA 和化学发光检测试剂盒均为 cell signal 公司产品;HRP 偶联的羊抗兔 IgG 二抗为 Santa Cruz 公司产品;EZ-Label™ FITC 蛋白质标记试剂盒和脱盐柱均为 Pierce 公司产品;引物合成及 DNA 测序均由 TaKaRa 公司完成;其他常规化学试剂为分析纯以上产品。

1.3　方法

1.3.1　*E. coli* DH5α 及 BL21(DE3)感受态细菌制备　　按《分子克隆实验指南》氯化钙法制备。

1.3.2　引物设计及合成　　按照人 Smad7 基因的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:AF015261),用 Primer5.0 软件辅助设计扩增人 Smad7 基因 CDS 全长序列的 PCR 引物(去除 Smad7 基因末端终止密码 TAG,因在其后还需引入 HA 标签序列);合成编码 TAT-PTD 和 HA 两个短肽的正、反义引物对,所有实验用引物序列见表 1。

表 1　实验中合成的引物序列

引物名称	引物序列
Smad7 正义引物	5′-CGCGGATCCATGTTCAGGACCAAACGA-3′(*Bam*HⅠ)
反义引物	5′-CCGGAATTCCCGGCTGTTGAAGATGAC-3′(*Eco*RⅠ)
HA-TAG 正义引物	5′-pAATTCTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTAGA-3′ (*Eco*RⅠ)
反义引物	5′-pAGCTTCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAG-3′ (*Hind* Ⅲ)
TAT-PTD 正义引物	5′-pCATGGATTACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGCCGCG-3′ (*Nco*Ⅰ)
反义引物	5′-pGATCCGCGGCGGCGCTGGCGGCGTTTCTTGCGGCCGTAATC-3′ (*Bam*HⅠ)

1.3.3　人 Smad7 基因 CDS 全长序列的 PCR 扩增　　以 pCDNA3-mSmad7 质粒为模板,反应体系为 5 × PCR buffer 6 μl, dNTP(2.5 mmol/L) 4 μl,PrimeStar DNA polymerase 0.35 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,pCDNA3-mSmad7 质粒 1 μl,无菌水 17.65 μl,总体系为 30 μl。扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 45 s,57 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min 40 s,共 30 个循环,72 ℃延伸 10 min。

1.3.4　TAT-PTD 正、反义引物及 HA-TAG 正、反义引物的自身退火　　分别将以上两短肽的等物质的量的正、反义引物链混合于 T_4 DNA 连接酶缓冲液中,将混合物于 PCR 仪中加热至 95 ℃ 2 min;在 15 min 内缓慢将以上混合物冷却至 50 ℃,并于 50 ℃条件下孵育 5 min 以使两互补链杂交,杂交后冷却至室温,-20 ℃保存备用。

1.3.5　pTAT-Smad7-HA 重组原核表达载体的构建　　分别将 TAT-PTD、Smad7 基因和 HA 片段依次连接入 pET32a(+)质粒构建成 pTAT-Smad7-HA 重组原核表达载体,转化感受态 DH5α 细菌,培养过夜,挑取在 Amp^r LB 平板上生长的部分阳性菌落,增菌后提取质粒,经双酶切鉴定得到按正确方向插入的 pTAT-Smad7-HA 重组质粒后保存备用。同时参考该方法构建对照 pSmad7-HA 重组质粒。

1.3.6　pTAT-Smad7-HA 的诱导表达及纯化　　pTAT-Smad7-HA 重组质粒转化 BL21(DE3)表达菌的方法参照《分子克隆实验指南》进行,挑选阳性菌株形成稳定的高表达细菌株,在含 100 μg/ml Amp 抗生素的 LB 平板中划线分纯后挑取单菌落接种入 5 ml 含 100 μg/ml Amp 抗生素的 LB 液体培养基中增菌,待 OD 值达到 0.4 ~ 0.6 后加入 IPTG 进行目的蛋白的诱导表达并筛选出最佳诱导浓度、时间及温度,并在最佳条件下扩大诱导。4 ℃收集菌体并超声破菌后分别收集细胞质可溶性蛋白和包涵体蛋白,进行蛋白定量后于 Ni-NTA 亲和层析柱中纯化,经含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱后,收集 TAT-Smad7-HA,PBS 透析脱盐处理后经 SDS-PAGE 鉴定其纯度。同时参考该方法行对照 Smad7-HA 蛋白的诱导表达和纯化。

1.3.7　TAT-Smad7-HA 融合蛋白的 Western blot 验证　　取纯化后经纯度鉴定的 TAT-Smad7-HA 融合蛋白进行 8% SDS-PAGE 变性电泳后,转移至 PVDF 膜,加入兔抗 HA-tag 多克隆

抗体(一抗,1∶500 稀释)于 4 ℃孵育过夜并洗膜后,再加入 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 抗体(二抗,1∶2 000 稀释)于 37 ℃孵育 2 h 后洗膜,并用化学发光试剂盒显色。同时参考该方法对 Smad7-HA 融合蛋白进行验证。

1.3.8 融合蛋白的切割、回收及 FITC 标记 所有操作按肠激酶切割回收试剂盒和 FITC 蛋白标记试剂盒说明书进行。经 FITC 成功标记后的蛋白记为 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白,同时将经同样处理后的对照 Smad7-HA 蛋白记为 FITC-Smad7-HA 融合蛋白。

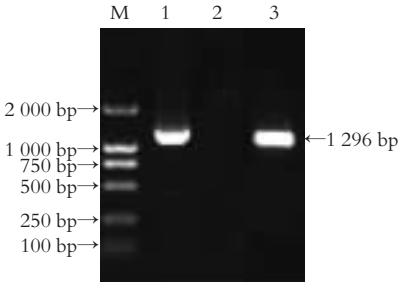
1.3.9 人原代 KFB 的培养 瘢痕疙瘩组织均采用组织块贴壁培养法进行体外培养。在无菌条件下切除表皮及皮下脂肪,将标本制成 1 mm^3左右的组织块,置于培养瓶中,在 95% 空气、5% CO_2、37 ℃饱和湿度条件下培养 8 ~ 12 h。然后加入含 15% Gibico 原代成纤维细胞培养专用胎牛血清的适量 DMEM 培养液,继续培养,3 ~ 4 d 换液 1 次,2 ~ 3 周后,待细胞生长成单层,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,按 1∶3的比例传代培养。实验用第 4 ~ 8 代对数生长期细胞。

1.3.10 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白转导人原代 KFB 取经 PBS 透析并经无菌过滤的 FITC-TAT-Smad7-HA 和 FITC-Smad7-HA 融合蛋白定量测定后,以 60 μg/ml 终浓度分别作用于人原代 KFB 15、30 min 和 1 h,PBS 洗涤 5 次,于荧光显微镜下照相。

2 结果

2.1 人 Smad7 基因 PCR 扩增产物的鉴定

以 pCDNA3-mSmad7 质粒为模板,扩增 Smad7 基因 CDS 全长序列,PCR 产物经凝胶电泳成像鉴定可见扩增出长度为 1 296 bp 左右的条带,长度与理论值一致(图 1)。

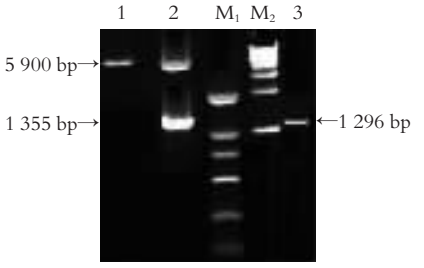


M:DNA 标准(DL 2000);2:无菌水阴性对照;1、3:Smad7 基因 CDS 全长序列

图 1 PCR 扩增产物鉴定

2.2 重组质粒 pTAT-Smad7-HA 的双酶切鉴定

pTAT-Smad7-HA 重组质粒经 *Nco* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切后的产物分别为 5 900 bp(为 pET32a 载体骨架)和 1 355 bp(为 TAT-Smad7-HA 的融合片段),与 pET32a 载体经 *Nco* Ⅰ单酶切后获得的条带(5 900 bp)和经 PCR 扩增得到的人 Smad7 基因 CDS 全长序列产物条带(1 296 bp,包括两个酶切位点的碱基在内)基本一致。重组质粒双向测序结果与理论值完全一致,原核表达载体 pTAT-Smad7-HA 构建成功(图 2)。

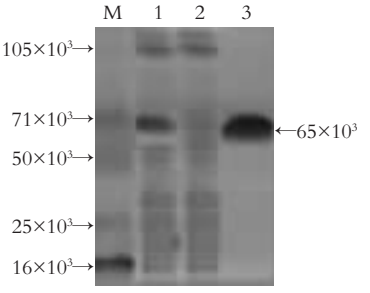


1:pET32a 载体的 *Nco* Ⅰ单酶切;2:pTAT-Smad7-HA 质粒的 *Nco* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切;M_1:DNA 标准(DL 2000);M_2:DNA 标准(DL 15 000);3:人 Smad7 基因 CDS 全长序列 PCR 扩增产物

图 2 重组质粒 pTAT-Smad7-HA 的双酶切鉴定结果

2.3 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的诱导表达及纯化

阳性 pTAT-Smad7-HA 表达菌在 25 ℃、1 mmol/L IPTG 诱导过夜的情况下 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的细胞质表达显著,在此条件下扩大诱导,收集菌体提取细胞质蛋白后测定浓度,并经 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定,在 65 × 10^3左右出现 1 条强表达带,符合预期的蛋白相对分子质量大小。经 BandScan 软件分析发现融合蛋白表达产物约占菌体总蛋白的 25%。蛋白产物经亲和层析得到有效纯化,纯度达 95% 以上(图 3)。

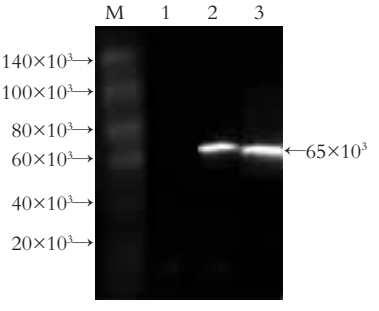


M:蛋白质分子量标准;1:IPTG 诱导组细菌蛋白;2:非诱导组细菌蛋白;3:纯化后的 TAT-Smad7-HA 融合蛋白

图 3 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的诱导表达及纯化结果

2.4 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的 Western blot 验证

经亲和纯化和纯度鉴定的 TAT-Smad7-HA 融合蛋白经 Western blot 检测,观察到在 65 × 10^3左右出现 1 条较强的目的条带(图 4)。

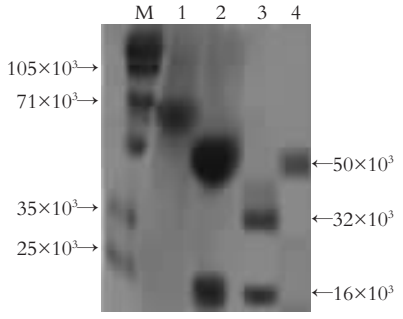


M:蛋白分子量标准;1:非诱导组菌体蛋白阴性对照;2:纯化后 TAT-Smad7-HA 融合蛋白;3:纯化后 Smad7-HA 融合蛋白

图 4 TAT-Smad7-HA 融合蛋白的 Western blot 验证

2.5　TAT-Smad7-HA 融合蛋白切割及目的蛋白的回收

TAT-Smad7-HA 融合蛋白经肠激酶切割并回收后，经 10% SDS-PAGE 鉴定可见相对分子质量分别为 50×10^3 左右的 TAT-Smad7-HA 蛋白条带和 16×10^3 左右的硫氧环蛋白条带，同时在阳性对照泳道发现相对分子质量分别为 32×10^3 左右的阳性对照蛋白条带和 16×10^3 左右的硫氧环蛋白条带，与试剂盒说明书提供的数据相一致（图 5）。

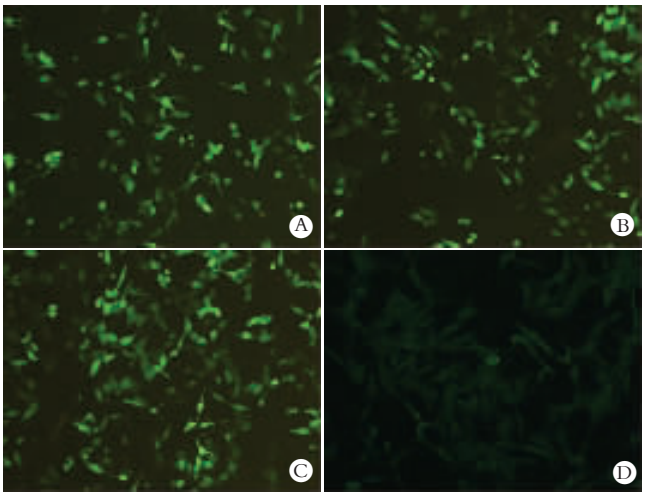


M：蛋白分子量标准；1：肠激酶切割前 TAT-Smad7-HA 融合蛋白；2：肠激酶切割后 TAT-Smad7-HA 融合蛋白；3：肠激酶切割后阳性对照（试剂盒自带）；4：切割并回收后 TAT-Smad7-HA 融合蛋白

图 5　肠激酶切割及回收蛋白电泳结果

2.6　FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白转导入细胞的检测

FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白分别作用于原代培养的人 KFB 15、30 min 和 1 h 后在荧光显微镜下观察到细胞内出现清晰明亮的绿色荧光，分布均匀，且在 1 h 之内绿色荧光随作用时间的延长而逐渐增强，而加入 FITC-Smad7-HA 融合蛋白的对照组细胞内仅观察到微弱的荧光背景，同时观察到 TAT 转导域可引导目的蛋白转导入视野内绝大多数细胞内（图 6）。



A、B、C：FITC-TAT-Smad7-HA 分别转导 15 min、30 min、1 h；D：FITC-Smad7-HA 转导 1 h

图 6　融合蛋白转导入细胞的检测结果　（荧光显微镜 ×400）

3　讨论

创伤后组织纤维化是外科领域的难题，而瘢痕疙瘩作为其中的一种典型病变，一直是研究的热点，也是整形外科所面临的一大难题。随着对创伤修复机制认识地不断加深，针对瘢痕疙瘩等病理性瘢痕的预防和治疗的研究已有不少报道[5,6]。人们希望通过人为干预的方法来改变愈合中的不利因素，改善瘢痕形成的进程。尽管瘢痕疙瘩的发病机制至今仍不清楚，但大量研究已经表明 TGF-β 可促进成纤维细胞增殖，增加胶原等细胞外基质的合成，其表达的增加与瘢痕的过度形成密切相关，其表达水平与各种纤维性疾病有很大的相关性[7]。TGF-β 的功能是通过 Smad 转导和正、负反馈的调节环路而自我调控的[8]。同时，Smad7 蛋白作为 TGF-β 超家族细胞内信号转导的主要抑制性分子，逐渐成为瘢痕疙瘩防治和治疗研究领域的热点和焦点问题[3,9]。研究表明，Smad7 蛋白主要由 DNA 结合区和受体结合区构成，早期主要定位于核内，TGF-β 受体活化后，Smad7 即从核内转移到细胞质，与 TGF-β Ⅰ型膜受体竞争性结合而抑制 TGF-β 信号的进一步传导。最近，孙燚[10]、虞海燕[11]、Yu[12] 等均发现在 KFB 细胞中存在 Smad7 表达降低导致的负反馈环路障碍，提示瘢痕疙瘩中 TGF-β 信号通路主要抑制性因子 Smad7 蛋白表达的减弱，这可能是瘢痕疙瘩形成的重要原因。因此，可以设想，通过携带该基因的载体增强 Smad7 的表达必定对 TGF-β 信号通路产生影响；另外，促进 Smad7 与 TGF-β Ⅰ型受体（TGF-β RI）的结合，如将 Smad7 蛋白的受体结合区或完整的 Smad7 蛋白作为蛋白治疗肽，通过一定的蛋白转运载体导入 KFB，通过竞争性结合 TGF-β RI 而抑制 TGF-β RI 的活化，形成负反馈调节环路，同样也将对 KFB 功能产生一定影响。本实验构建了 TAT-Smad7-HA 融合蛋白表达载体，并成功地进行了目的蛋白的大量诱导表达、纯化、验证和 FITC 标记，验证了 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白在 KFB 中的高转导活性，为进一步研究 Smad7 蛋白治疗肽对 TGF-β 信号通路的抑制效应提供了实验基础，并为 Smad7 治疗肽在临床的应用奠定了理论基础。

文献[3]报道，用含有人 Smad7 基因的重组腺病毒感染人 KFB 细胞后，能阻断 TGF-β 的细胞内信号转导通路，并能抑制瘢痕疙瘩的形成。但鉴于腺病毒载体的过表达会引起宿主发生急性炎症反应、排斥反应、生理状态的改变甚至致瘤性，进一步探索新的 Smad7 基因或蛋白的介导方案势在必行。目前，TAT-PTD 介导的蛋白肽的治疗策略已广泛应用于各种疾病治疗研究中，但存在作用时间比较短，仅有数小时至数天的主要缺陷，因此不适用于长期的疾病治疗。由于瘢痕疙瘩形成是一个相对较短的病理过程且其病灶往往较表浅，所以反而适合应用 PTD 融合治疗肽进行局部原位注射治疗。我们已经验证了 TAT-Smad7-HA 融合蛋白在 KFB 中的高转导活性，在后续实验也将研究其对 KFB 生物学活性的影响。同时，鉴于近年来瘢痕疙瘩

动物模型建模研究工作的不断进展[13],本课题组将在后续的实验中将 FITC-TAT-Smad7-HA 融合蛋白作用于瘢痕疙瘩动物模型的瘢痕组织局部,预期所纯化的治疗肽可以较高的转导效率转导入细胞膜,发挥抑制 TGF-β 信号转导通路的功能,并将有可能进一步推广应用到 TGF-β 乃至其超家族的信号转导及功能研究之中,为 Smad7 治疗肽在瘢痕疙瘩预防和治疗的临床应用奠定实验和理论基础。

参考文献:

[1] Greenhalgh D G. Frontiers in wound healing[J]. Problems in General Surgery, 2003, 20(1):70 - 79.

[2] 王丹茹, 刘 伟, 武晓莉, 等. 人 Smad7 腺病毒表达载体的构建及体外表达[J]. 生物医学工程学杂志, 2005, 22(4): 769 - 772.

[3] Kopp J, Preis E, Said H, *et al*. Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2005, 280(22):21570 - 21576.

[4] Langedijk J P, Olijhoek T, Schut D, *et al*. New transport peptides broaden the horizon of applications for peptidic pharmaceuticals[J]. Mol Divers, 2004, 8(2): 101 - 111.

[5] Cutroneo K R. TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(Suppl 1): S54 - S60.

[6] Gao Z, Wang Z, Shi Y, *et al*. Modulation of collagen synthesis in keloid fibroblasts by silencing Smad2 with siRNA[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 118(6): 1328 - 1337.

[7] Polo M, Smith P D, Kim Y J, *et al*. Effect of TGF-beta2 on proliferative scar fibroblast cell kinetics[J]. Ann Plast Surg, 1999, 43(2): 185 - 190.

[8] Heldin C H, Miyazono K, ten-Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature, 1997, 390(6659): 465 - 471.

[9] Colwell A S, Faudoa R, Krummel T M, *et al*. Transforming growth factor-beta, Smad, and collagen expression patterns in fetal and adult keratinocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(3): 852 - 857.

[10] 孙 燚, 宋建星, 汪滋民, 等. TGF-βRⅠ、Smad2、Smad3 及 Smad7 在瘢痕疙瘩中的表达[J]. 中华整形外科杂志, 2006, 22(5): 368 - 370.

[11] 虞海燕, 陈大方, 方 青. 瘢痕疙瘩皮损中抑制型 SMAD mRNA 的低表达[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2006, 32(1): 92 - 95.

[12] Yu H, Bock O, Bayat A, *et al*. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006, 59(3): 221 - 229.

[13] 倪云志, 郭树忠. 瘢痕动物模型的研究进展[J]. 中国美容医学, 2005, 14(3): 377 - 379.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)23-2202-01

50 例妊娠期妇女凝血指标变化及其意义

唐固平[1], 李 波[2] ([1] 达州市第二人民医院妇产科, 四川 达州 635000; [2] 泸州医学院肝胆外科, 四川 泸州 646000)

与非妊娠妇女相比,妊娠期妇女的凝血功能会发生变化[1]。我院 2004 年以来妊娠期妇女进行凝血 4 项检测,结果如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

非妊娠期妇女组 50 例,年龄 18 ~ 34 岁,均为健康体检者,无出血、血栓性和肝脏疾病及家族史;正常妊娠妇女组 50 例,年龄 21 ~ 37 岁,均为妊娠中晚期住院待产孕妇,无出血、血栓性和肝脏疾病及家族史疾病。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 全部为清晨空腹采静脉血 1.8 ml,加入含 0.2 ml 109 mmol/L 枸橼酸钠的真空抗凝管(IMPROVE)中立即混匀,3 000 r/min 离心 15 min 后取血浆,上机 2 h 内检测。

1.2.2 试剂与仪器 用日本 SYSMEX 公司生产的 CA-1500 型全自动血液凝固仪检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(Fbg),采用原装试剂盒,每天都做严格的质控,测定值均在当日质控通过的情况下进行检测。

1.3 统计学处理

测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验。

2 结果

妊娠组与非妊娠组比较,PT、APTT 和 TT 无差异,但是 Fbg 增加,有显著性差异($P < 0.01$)。

表 1 妊娠期与非妊娠期妇女凝血 4 项检测结果($n = 50$)

组别	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	Fbg(g/L)
妊娠组	14.24 ± 1.27	35.93 ± 2.75	15.24 ± 1.27	5.65 ± 0.67
非妊娠组	14.78 ± 1.43	34.68 ± 3.86	15.33 ± 2.51	3.42 ± 0.34
t	0.44	0.46	0.92	0.00
P	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01

3 讨论

正常人体内凝血与抗凝血呈动态平衡状态。在妊娠期妇女体内激素水平发生变化,血清雌、孕激素水平逐渐升高,这些

(下转 2206 页)

作者简介:唐固平,女,四川省达州市人,主治医师,主要从事妇科方面的研究,发表论文 9 篇。E-mail:271612038@qq.com

通信作者:李 波,电话:13518371998

收稿日期:2008-08-27;修回日期:2008-09-21