文章编号:1000-5404(2010)03-0201-05

论著

人卵巢癌微血管内皮细胞的培养及体外管腔样结构形成的观察

徐 燕,王 丹,谢 尧,梁志清 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 建立人卵巢癌微血管内皮细胞(ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cells,ODMECs)免疫磁珠分选体系并观察ODMECs体外二维管腔样结构(tubule-like structure,TLS)的形成。**方法** 利用结合有CD31抗体的MACS MicroBeads免疫磁珠分选系统分离纯化ODMECs。通过形态学、生化和表型特征对所获得的ODMECs进行鉴定;并检测其摄取乙酰化低密度脂蛋白(acetylated-low-density lipoprotein,DIL-acLDL)和结合凝集素Ⅰ(UEA-Ⅰ)的能力,观察其在体外培养体系中二维管腔样结构的形成。**结果** 所获ODMECs流式分析细胞纯度可达99.6%,具有卵石征、接触抑制,表达CD31、CD105、FⅧ-Rag;具有结合UEA-Ⅰ和摄取DIL-acLDL的能力;培养过程中观测到ODMECs可形成二维管腔样结构。**结论** 成功建立了人ODMECs的免疫磁珠分离培养方法,并观察到ODMECs具有体外二维管腔样结构。

[关键词] 卵巢肿瘤;毛细血管;内皮细胞;细胞,培养的;免疫磁化分离
[中图法分类号] R737.31; R322.13; R329-33 **[文献标志码]** A

Incubation of human ovarian cancer microvascular endothelial cells and formation of lumen-like structure *in vitro*

Xu Yan, Wang Dan, Xie Yao, Liang Zhiqing (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish the magnetic activated cell sorting system (MACS) for isolation and incubation of human ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cells (ODMECs) and to observe their ability to form tubule-like structure (TLS) *in vitro*. **Methods** MACS was used to purify ODMECs with antiCD31 antibody and ODMECs were identified according to their morphological, biochemical and phenotypic characteristics. The ability of ODMECs to intake acetylated-low-density lipoprotein (DIL-acLDL) and Ulex europeaus agglutinin-1 (UEA-Ⅰ) was assayed to observe the formation of TLS *in vitro*. **Results** Flow cytometry showed that the purity of ODMECs was up to 99.6%. The ODMECs were characterized by cobble stones, contact inhibition, expressed CD31, CD105 and FⅧ-Rag, and exhibited the ability to bind to UEA-1, intake DIL-acLDL and form TLS during incubation. **Conclusion** The MACS we established can be used to isolate and incubate human ODMECs and study the formation characteristics of TLS.

[Key words] magnetic beads; microvascular endothelium cell; ovarian carcinoma; cell culture

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600673) and the "Eleventh Five-Year Plan" for Military Science and Technology of Youth Fund Project (06Q054). Corresponding author: Liang Zhiqing, Tel: 86-23-68754409, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

由于肿瘤的生长和转移离不开血管的生成,因此抗肿瘤血管生成一直是研究的热点。多项研究表明,受微环境的影响,肿瘤血管内皮细胞在形态结构、基因的表达,以及遗传学水平具有异质性[1],这一特点推动了来源于不同瘤体组织的微血管内皮细胞分离和培养[2-4]。目前体外培养血管内皮细胞已成为实验室常规方法[5,6],其广泛应用已有30多年的历史,在此期间分离来源于不同组织的血管内皮细胞特别是微血管的方法得以不断改进和提高。在前期实验中我们利用卵巢癌微血管内皮细胞(ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cells,ODMECs)的密度不同于非内皮细胞这一特点,采用梯度密度离心法成功分离出了ODMECs[7]。但是由于上述方法一次分选的细胞量少,使ODMECs获得率低,并且所得细胞活性低,生长缓慢,难以满足后续实验要求。因此在本研究中,我们参考蒋雪峰[6]和Schellerer等[8]的免疫磁珠分选法,通过连接有CD31抗体的磁性微珠进行阳性分选,建立了简便、快速的分选体系并观察ODMECs体外二维管腔样结构。

[基金项目] 国家自然科学基金(30600673);全军医学科研"十一五"计划青年基金(06Q054)
[通信作者] 梁志清,电话:(023)68754409, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

1 材料与方法

1.1 标本来源

卵巢癌组织取自西南医院妇产科住院患者2008年8月至2009年6月卵巢癌手术切除新鲜标本,患者平均年龄53岁,病理诊断符合卵巢上皮性恶性肿瘤,临床病理分期Ⅰc期2例、Ⅲc期13例、Ⅲb期2例、Ⅳ期2例,总计19例。患者术前均未接受放化疗,为初次行卵巢癌细胞减灭术17例和卵巢癌全面分期术2例。

1.2 主要试剂

EGM-MV完全培养基为Lonza公司产品;标准胎牛血清FBS、Ⅰ型胶原酶、明胶为美国Sigma公司产品;胰酶为博大泰克产品[7];dNaseⅠ为华美生物产品。免疫磁性分选仪、分选柱、CD31直标磁珠、CD31-PE抗体、CD34-PE抗体为德国MiltenyiBiotec公司产品;低密度脂蛋白为Invitroge公司产品;FITC-UEA-I为Sigma公司产品;CD31、CD105、FⅧ-RAg抗体、S-P免疫组化试剂盒为北京中杉公司产品。RT- PCR试剂盒购于大连TaKaRa生物公司。

1.3 人卵巢癌微血管内皮细胞的磁性分选与鉴定

1.3.1 磁珠分选前标本的制备 无菌条件下PBS漂尽癌块残血,去除包膜及出血、坏死部分,剪至3~5 mm^3大小[7]。0.25%胰酶37 ℃消化10~15 min,收集沉淀。0.5 mg/ml Ⅰ型胶原酶于37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱中消化10~15 min后,加入0.02% dNase Ⅰ酶继续消化60~70 min;洗涤,重悬,200目筛网过滤,收集滤液。EGM-MV完全培养基(含20%优等胎牛血清、牛脑提取物、hEGF、氢化可的松)重悬,调整细胞密度至3×10^5/ml,接种于2%明胶预包被的培养瓶中,37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱培养24~72 h。

1.3.2 MACS CD31 MicroBeads阳性分选内皮细胞 当培养瓶中细胞长至近70%~90%融合状态时,利用MACS免疫磁珠内皮细胞分选系统纯化ODMECs。PBS漂洗2~3次去除死细胞和血细胞,0.25%胰酶与0.02% EDTA液消化3 min直至细胞完全分离,离心收集沉淀。按每1×10^7个细胞加入60 μl MACS buffer的体系重悬细胞,20 μl抗原封闭剂以及20 μl CD31直标磁珠4 ℃避光孵育15 min,MACS buffer洗涤,重悬。在磁架上安装好MS分选柱,润柱,细胞悬液缓慢通过分选柱,MACS buffer洗脱细胞。连续过第2根MS柱,两次阳性分选以提高ODMECs纯度。EBM-MV完全培养基用于最后的细胞洗脱,调整细胞密度至3×10^5/ml,接种于2%明胶包被的培养板,每2天更换培养液1次,直到细胞融合。传代时PBS洗3次,0.25%胰酶+0.02% EDTA液消化3~5 min,按1∶3进行接种。

1.3.3 细胞活力测定 磁珠分选后取2 μl细胞悬液,用34 μl的PBS+4 μl 0.04%台盼蓝混匀,室温静置2~3 min,血球计数板计数,镜下细胞蓝染为活细胞。

1.3.4 FACS流式分析ODMECs的纯度 分别收集MACS CD31免疫磁珠分选前和分选后的细胞,FACS-PBS缓冲液液重悬,调整细胞浓度至1×10^5/ml,分为2管,4 ℃避光分别与PE-CD31、PE-CD34(1∶10;MiltenyiBiotec,Germany)孵育10 min,洗涤,重悬。避光送流式细胞检测,PBS用作阴性对照。

1.3.5 RT-PCR检测 检测分选后CD31阴性表达和CD31阳性表达细胞中Endoglin的表达情况。收集经CD31磁珠分选后CD31阴性表达和CD31阳性表达细胞,按Trizol操作说明,分别提取各组标本中的细胞总RNA。然后按RT-PCR操作说明进行。Endoglin上游引物5′-CGCACCGATCCAGACCACTC-3′,下游引物5′-CCCGGCTCGATGGTGTTGGA-3′,产物片段长396 bp;内参照基因人GAPDH上游引物5′-GAAGGTGAAG-GTCGGAGTC-3′,下游引物5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′,产物片段长220 bp[9]。扩增参数如下:95 ℃预变性2 min,然后94 ℃变性30 s,62 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共进行35个循环,最后72 ℃延伸5 min。

1.3.6 FⅧ-Rag、CD31的表达情况 准备细胞爬片,将生长于盖玻片上的细胞用4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS漂洗,检测FⅧ-Rag时需用0.13% Triton X-100室温处理20 min,S-P法染色,DAB显色,细胞质染为棕黄色为阳性。在检测膜抗原CD31时不做Triton X-100处理,S-P法染色,DAB显色,苏木精复染,细胞膜染为棕黄色为阳性。阴性对照均用PBS代替一抗。

1.3.7 ODMECs结合UEA-1以及摄取乙酰化低密度脂蛋白的能力 磁珠分选后细胞爬片,取近60%~70%融合的细胞,PBS漂洗3次,加入含10 μg/ml乙酰化低密度脂蛋白(acetylated-low-density lipoprotein,DIL-acLDL)的EBM培养基,37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱中培养3~4 h,PBS漂洗3次,2%~4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3次,含10 μg/ml UEA-FITC的去离子水,37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱中孵育30 min,PBS漂洗3次,甘油封片。磁珠分选后CD31阴性表达细胞作为阴性对照。激光共聚焦检测并照相,细胞质为绿色荧光为结合UEA-1阳性结果,胞质出现颗粒状红色荧光为摄取乙酰化低密度脂蛋白阳性结果。

1.4 ODMECs体外管腔样结构形成的观察

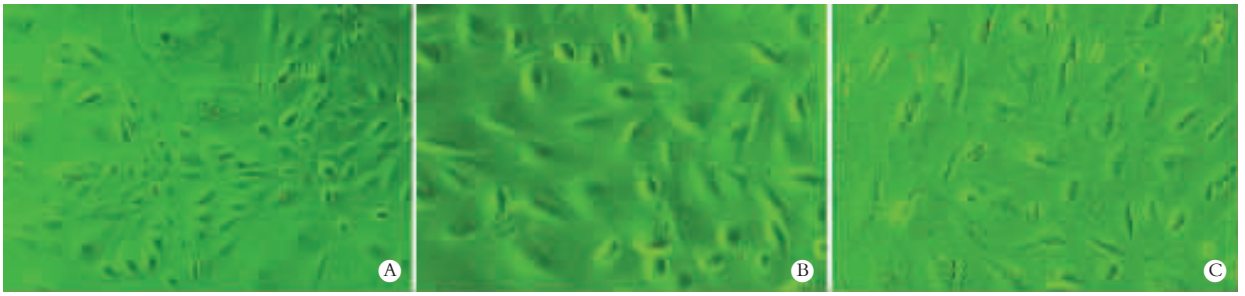
1.4.1 培养中ODMECs自发性管腔样结构的形成 磁珠分选后,调整细胞密度至2×10^4/ml,接种于无明胶包被的24孔培养板,每2天更换培养液1次,于37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱中培养5~7周,直至ODMECs自发性管腔样结构的形成。

1.4.2 ODMECs在细胞外基质上管腔样结构的形成 取指数生长期ODMECs细胞,0.25%胰酶和0.02% EDTA酶消化3~5 min,调整细胞浓度至2×10^4/ml,接种于纤维连接蛋白(clotted fibrin,FN)预包被的24孔细胞培养板中,无血清EBM培养液中加入10 ng/ml ECGS生长因子,置37 ℃、5% CO_2、95%空气饱和湿度培养箱中培养,每2天更换培养液1次。毛细管腔形成情况由连接有数字式照相机的倒置光学显微镜记录。

2 结果

2.1 原代ODMECs呈现不均一性

酶消化后接种于培养瓶内,24 h后细胞开始贴壁,形态多样,不规则,主要为上皮样细胞,其间可见悬浮的血细胞,少量死细胞,细胞80%融合后,可进行免疫磁珠分选。磁珠分选后的内皮细胞活力好,活细胞台盼蓝着色>98%,细胞呈多边形、短梭形、铺路石样形态,大小不一,生长至融合状态时成单层片状且有接触抑制,原代ODMECs细胞大小不均一(图1A),培养3~4 d后,细胞数量逐渐增多,平均7~9 d传代培养1次,传代后ODMECs细胞大小趋于一致(图1B),老化后的人卵巢癌微血管内皮细胞质浓缩,呈现“煎鸡蛋样”改变(图1C)。



A:原代 ODMECs(×100) ;B:传代培养的 ODMECs(×200) ;C:老化后的 ODMECs(×200)

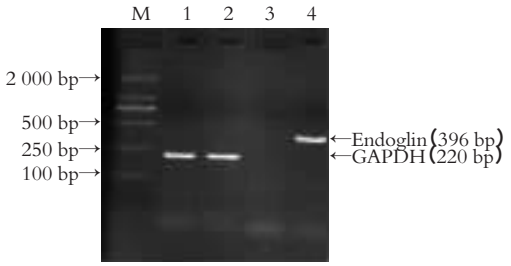
图 1　倒置相差显微镜观察 ODMECs 形态学的变化

2.2　流式检测 ODMECs CD31 和 CD34 的表达情况

磁珠分选前 CD31 阳性细胞约占总细胞的 4.77%。过 1 次分选柱后,CD31 表达阳性的细胞占 40.61%;经过连续 2 次阳性分选,CD31 阳性细胞含量可达 99.65%。此外 ODMECs 细胞还表达 CD34。

2.3　Endoglin 在 ODMECs 的表达情况

RT-PCR 检测分选后 ODMECs 中 Endoglin mRNA 的表达(图 2)。经 CD31 磁珠分选后阴性的细胞无 Endoglin mRNA 的表达,而 CD31 表达阳性的细胞有 Endoglin mRNA 的表达。表明分选后并未漏选表达 Endoglin 的新生血管内皮细胞。

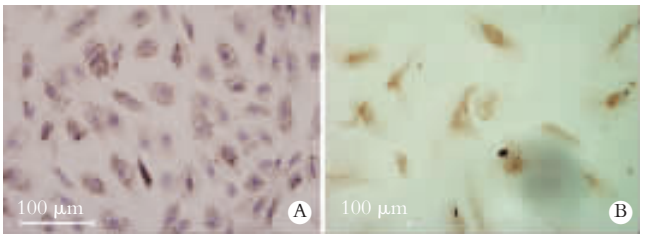


M:标准;1:CD31 阴性细胞内参 GAPDH 基因;2:CD31 阳性细胞内参 GAPDH 基因;3:分选后 CD31 阴性细胞 Endoglin;4:分选后 CD31 阳性细胞 Endoglin

图 2　RT-PCR 检测 ODMECs 中 Endoglin mRNA 的表达

2.4　免疫细胞化学检测 CD31、FⅧ-Rag 的表达

ODMECs 中 FⅧ-Rag 表达于 ODMECs 的细胞质(图 3A);CD31 则表达于 ODMECs 的细胞膜(图 3B)。阴性对照组均无着色。



A: ODMECs 中 CD31 的表达;B:ODMECs 中 FⅧ-Rag(vwF)的表达

图 3　免疫细胞化学检测 CD31、FⅧ-Rag 的表达　(S-P)

2.5　ODMECs 具有结合 UEA 和摄取乙酰化低密度脂蛋白的能力

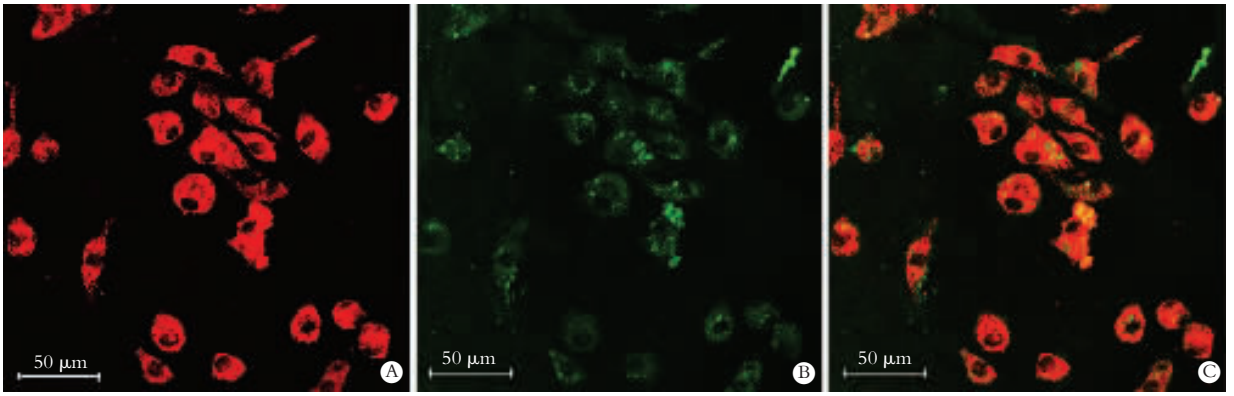
乙酰化低密度脂蛋白(DIL-acLDL)可被微血管内皮细胞通过“细胞清除旁路”所吸收,被溶酶体所降解,沉积于溶酶体膜上。此外,人微血管内皮细胞还可以特异性的结合 I 型荆豆凝集素(ulex europaeus agglutinin,UEA-1)。研究表明人 ODMECs 具有结合 UEA-1 和摄取乙酰化低密度脂蛋白的能力(图 4),见细胞质内绿色荧光和颗粒状的红色荧光。

2.6　自发性管腔样结构的形成

ODMECs 在无明胶包被的培养板内,于培养第 5 ~ 6 周可自发的形成管腔样结构。这种管腔样结构的特点是在融合后的单层 ODMECs 上继续生长而成,倒置显微镜下可见管腔样结构下铺垫的单层内皮细胞层(图 5A)。

2.7　体外培养的 ODMECs 在细胞基质上管腔样结构的形成

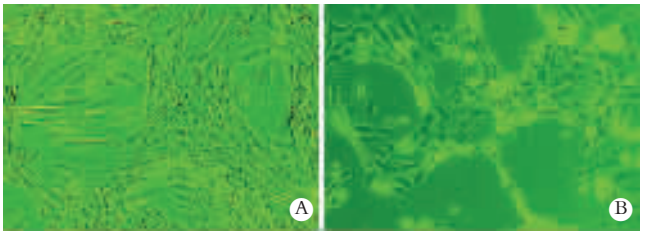
在纤维连接蛋白包被,含生长因子 ECGS 的无血清 EBM 培养基中,相邻 ODMECs 的细胞质首先呈现出芽状生长,细胞变



A:ODMECs 对 DIL-acLDL 的摄取;B:ODMECs 可结合 UEA-I;C:联合检测 ODMECs 结合 UEA-I 和摄取低密度脂蛋白 DIL-ac-LDL 的能力

图 4　ODMECs 结合 UEA-I 和摄取 DIL-acLDL 的激光共聚焦观察

为“Y”或“1”字,进而连接成网状。在形成二维结构的内皮细胞中可以观察到胞核较大,说明细胞遗传物质增多,细胞处于活越期(图5B),管型结构可维持2~3 d,此后细胞开始脱壁悬浮,进而崩解。



A:在无基质包被的培养板内自发性管腔样结构的形成;B:在纤维连接蛋白上形成的管腔

图5 ODMECs形成管腔样结构 (倒置相差显微镜 ×100)

3 讨论

血管发生是卵巢癌演进的早期事件,在低度潜在恶性瘤体中既有出现[10]。除此以外有研究表明卵巢癌术后应激可刺激交感神经β受体,加速血管生成,从而促进肿瘤微小转移灶和术后残余肿瘤的生长[11]。因此抗卵巢癌血管生成的治疗有其研究的前景[12,13],所以需要建立一套稳定而又快速、简便的人卵巢癌微血管内皮细胞的体外培养体系。在前期实验中,我们采取了物理刮除法、差数贴壁法、密度梯度沉降法来分离纯化ODMECs,但是操作繁琐,细胞获得率较低、生长缓慢,往往需要10~15 d才能见到明显的内皮细胞集落形成[7]。而使用连接有特异性抗体的免疫磁珠分选,可简化实验步骤,提高细胞获得率和存活率。磁珠分选法是由玻珠法发展而来,Abbot曾报道过用Ⅰ型荆豆凝集素(ulex europaeus agglutinin,UEA-1)包被的甲苯磷酸激活的聚苯乙烯来筛选内皮细胞。目前磁珠分选法广泛应用于各种器官组织的微血管内皮细胞以及各种肿瘤性微血管内皮细胞的纯化中,较常使用的标记物有荆豆凝集素UEA-1、CD31、CD34、CD146、CD105等。我们用免疫组化法标记卵巢癌血管发现,CD31在卵巢癌血管强表达,而CD105主要表达于微血管特别是一些尚未成型的血管,甚至在卵巢癌的间质也有少量的表达。并且文献[4]报道用CD31抗体作为美天妮磁珠分选的标记,所得内皮细胞的纯度较用CD105作为分选标记高。因此本实验选择CD31作为磁性分选的标记,与percoll密度梯度离心法相比,简化了操作步骤,缩短了操作时间,提高了ODMECs的纯度。并且通过检测endoglin基因mRNA表达情况可初步判定用CD31作为免疫磁珠分选标记物不会漏选新生血管内皮细胞。研究发现,ODMECs在卵巢癌组织中只占4%~5%,含量低,在进行磁珠分选时采用连续通过两根分选柱,分选效率可由40.61%提高到99.65%。磁珠分选前标本的制备是分选得以成功的关键,细胞成团或死细胞>10%将明显影响分选后内皮细胞的纯度。当细胞总量在2×10^8/ml时,分选所得细胞数量充足,更易生长增殖。

对ODMECs的鉴定需要多指标联合评估,在形态学上原代培养的ODMECs呈现出不均一性,有的短圆,有的比较瘦长,大小亦存在差异,二者可混杂生长亦可呈区域分布,传代后上述不均一性有所减少。ODMECs除了表达FⅧ-Rag、CD105、CD34、FⅧ外,还可以通过“细胞清除旁路”吸收乙酰化低密度脂蛋白(ALL),并在溶酶体降解,沉积于溶酶体膜上,其特异性明显优于FⅧ-Rag。同时,ODMECs可以特异性地结合Ⅰ型荆豆凝集素。本实验采用联合检测ODMECs结合UEA-I和摄取低密度脂蛋白DIL-ac-LDL的能力,来鉴定卵巢癌微血管内皮细胞,提高了准确性和特异性。

体外血管模型主要研究血管的生理和病理,以及药物的作用。根据培养方式不同分为二维血管和三维血管[14,15],二维血管指细胞在底物的表面形成管样结构;三维血管指细胞侵入周围含生物胶的基质形成管样结构。在培养ODMECs的过程中我们发现,ODMECs在无细胞外基质的培养池内,于第5~6周时,可自发地形成管腔样结构。其特点表现为ODMECs先形成单细胞层,随后再在单细胞层上出现管腔样结构,但是这种二维结构并非每次培养都会出现,所以会给研究带来诸多不便。而ODMECs在纤维连接蛋白上则可迅速表现出血管发生行为,细胞接种不易过密,表现为单个细胞出芽状生长,继而连接成线状和管腔状。

综上所述,本实验运用抗CD31的免疫磁珠与内皮细胞特异性结合的原理,分离获得了高纯度可传代并具有体外二维管腔样结构形成特性的ODMECs,建立起简便快速的卵巢癌微血管内皮细胞体外培养体系,纯度与活力明显优于用percoll密度梯度离心法分离所得的ODMECs,为后续研究卵巢癌抗血管生成提供了良好的实验材料。

参考文献:

[1] Hida K, Hida Y, Shindoh M. Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies[J]. Cancer Sci, 2008, 99(3): 459-466.

[2] Patel V A, Logan A, Watkinson J C, *et al*. Isolation and characterization of human thyroid endothelial cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 284(1): E168-E176.

[3] Li W, Sabater A L, Chen Y T, *et al*. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells[J]. In-

vest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(2): 614-620.
[4] Grange C, Bussolati B, Bruno S, *et al*. Isolation and characterization of human breast tumor-derived endothelial cells[J]. Oncol Rep, 2006, 15(2): 381-386.
[5] 陈黎, 梁志清, 李俊男. 人胎盘微血管内皮细胞体外原代培养及鉴定方法[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 907-909.
[6] 蒋雪峰, 卞修武, 王清良, 等. 人脑恶性胶质瘤微血管内皮细胞的分离培养与体外血管生成特性[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 291-294.
[7] 徐燕, 梁志清, 王丹, 等. 人卵巢癌微血管内皮细胞的培养与鉴定[J]. 西部医学, 2009, 21(8): 1260-1263.
[8] Schellerer V S, Croner R S, Weinlander K, *et al*. Endothelial cells of human colorectal cancer and healthy colon reveal phenotypic differences in culture[J]. Lab Invest, 2007, 87(11): 1159-1170.
[9] Miller D W, Graulich W, Karges B, *et al*. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells[J]. Int J Cancer, 1999, 81(4): 568-572.
[10] Menakuru S R, Brown N J, Staton C A, *et al*. Angiogenesis in pre-malignant conditions[J]. Br J Cancer, 2008, 99(12): 1961-1966.
[11] Lee J W, Shahzad M M, Lin Y G, *et al*. Surgical stress promotes tumor growth in ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8): 2695-2702.
[12] Kohn E C, Fidler I J, Fishman D, *et al*. Discussion: metastasis and angiogenesis in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 88(1 Suppl 1): S37-S42.
[13] Buckanovich R J, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, *et al*. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(7): 852-861.
[14] Op-den-Buijs J, Musters M, Verrips T, *et al*. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(6): H26512-H26518.
[15] Kladakis S M, Nerem R M. Endothelial cell monolayer formation: effect of substrate and fluid shear stress[J]. Endothelium, 2004, 11(1): 29-44.

(收稿:2009-09-21;修回:2009-10-19)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2010)03-0205-01

个案与短篇

短期应用小剂量甲强龙治疗婴儿重症肺炎43例

汪龙辉,王 强,吴小玲 (332000 江西 九江,江西省九江市妇幼保健院儿科)

[关键词] 肺炎;甲泼尼龙;婴儿
[中图法分类号] R725.631 [文献标志码] B

婴儿重症肺炎是儿科的急症,及时、合理、准确的诊断与治疗,大多预后良好[1]。我科2008年1月至2009年1月婴儿重症肺炎在常规治疗的同时短期应用小剂量的甲泼尼龙琥珀酸钠(商品名为甲强龙,以下简称甲强龙),疗效明显,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2008年1月至2009年1月我科符合婴儿重症肺炎诊断标准[2]的住院患儿85例,按住院先后的单双号顺序分为2组,单号为治疗组,双号为对照组。治疗组43例,男性23例,女性20例,小于6个月29例,6~12个月14例;对照组42例,男性22例,女性20例,小于6个月27例,6~12个月15例。2组年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法

2组患儿均给予头孢他定(复达欣)抗感染[100 mg/(kg·d),分2次],根据各自病情分别给予多巴胺及多巴酚丁胺、西地兰、速尿(呋噻米)、给氧及镇静等处理;治疗组另加用小剂量的甲泼尼龙琥珀酸钠(Pfizer Manufacturing Belgium NV, H20060054),用法为每次2 mg/kg,每日2次,连用3 d后渐停。观察2组症状、体征的改善情况,注意有无水钠潴留及炎症扩散,治疗前及治疗后均查血像及血电解质。

1.3 疗效判定

治愈:并发症纠正、热退、无咳嗽气喘、肺部干湿性啰音消失;好转:并发症纠正、热退,咳嗽气喘明显缓解,肺部干湿啰音减少;无效:症状体征改善不明显。

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件行t检验及χ^2检验。

2 结果

2.1 2组症状及体征总疗程比较

结果见表1。治疗组在咳喘消失时间、啰音消失时间及总疗程均对照组明显缩短,经统计学检验,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 2组症状、体征及总疗程比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	咳喘消失时间(d)	啰音消失时间(d)	总疗程(d)
治疗组	43	7.1±1.1	6.2±0.8	7.9±1.7
对照组	42	9.4±1.3	8.7±1.4	11.5±1.9
t		8.8	10.1	9.2
P		<0.05	<0.05	<0.05

[通信作者] 汪龙辉,E-mail: wlhlss@yahoo.cn

(下转209页)