文章编号:1000-5404(2012)03-0187-05

论著

抗 hMIF 单克隆抗体的活性鉴定及其对脓毒症小鼠的保护作用

张 阳[1],陈 莎[1],胡川闰[1],李淑慧[1],万 瑛[2] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床生物化学教研室[1],科研部中心实验室[2])

[摘要] **目的** 对制备的人巨噬细胞移动抑制因子(anti-human macrophage migration inhibitory factor, hMIF)单克隆抗体进行生物学活性鉴定,并研究其对脓毒症小鼠的保护作用。**方法** 通过 ELISA、Western blot、免疫组织化学等方法鉴定抗 MIF 单克隆抗体 F11 的亚类、抗体亲和力及特异性;通过一氧化氮(nitric oxide, NO)释放抑制试验和异构酶活性抑制试验,鉴定 F11 抗体的生物学活性;选用 C57BL/6J 小鼠构建 CLP、LPS 诱导脓毒症模型,研究 F11 抗体对脓毒症小鼠生存率的保护作用及对血清细胞因子 TNF-α、IL-6 的影响。**结果** F11 抗体亚类为 IgG1 型,亲和力为 2.5×10^{10}, Western blot 及免疫组织化学显示强阳性;F11 抗体显著抑制 MIF 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO($P<0.01$)及 MIF 异构酶活性($P<0.01$);明显提高脓毒症小鼠生存率(CLP 模型:$P<0.01$,LPS 模型:$P<0.05$)且具有剂量依赖关系,并对 CLP 术后血清 TNF-α 和 IL-6 的升高具有明显抑制作用($P<0.05$)。**结论** 成功制备了高特异性、高亲和力、具有异构酶活性抑制作用的抗 MIF 单克隆抗体,显著提高致脓毒症模型小鼠生存率并降低小鼠血清 TNF-α、IL-6 水平。

[关键词] 巨噬细胞移动因子;脓毒症;单克隆抗体
[中图法分类号] R631.2; R392.11; R392.2 [文献标志码] A

Bioactivity identification of anti-hMIF monoclonal antibody and its protective effect on sepsis mice

Zhang Yang[1], Chen Sha[1], Hu Chuanmin[1], Li Shuhui[1], Wan Ying[2] ([1]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, [2]Instrumental Analysis Centre, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify bioactivity of anti-human macrophage migration inhibitory factor (hMIF) monoclonal antibody (mAb) F11, and to investigate its protective effect on sepsis mice. **Methods** Subclass, affinity and specificity of anti-hMIF mAb F11 were analyzed by ELISA, Western blotting and immunohistochemistry. Bioactivity of mAb F11 was identified by nitric oxide (NO) release inhibition test in MIF-stimulated RAW264.7 cells and tautomerase activity inhibition test. Protective effect of mAb F11 and its effect on serum levels of TNF-α and IL-6 were determined in C57BL/6J mice model of sepsis. **Results** The mAb F11 was of IgG1 subclass, and its affinity was 2.50×10^{10}. Western blotting and immunocytochemistry showed strong positive signals. In bioactivity research, mAb F11 significantly inhibited NO releasing from MIF-stimulated RAW264.7 cells as well as the activity of MIF tautomerase ($P<0.01$). mAb F11 significantly improved the survival rate of sepsis mice (CLP model: $P<0.01$; LPS model: $P<0.05$) in a dose-dependent manner, and significantly suppressed the elevation of serum levels of TNF-α and IL-6 ($P<0.05$). **Conclusion** Anti-MIF mAb F11 is successfully prepared, which has high specificity and affinity. The mAb F11 can inhibit activity of MIF tautomerase, significantly improve the survival rate of sepsis mice and reduce serum levels of TNF-α and IL-6.

[**Key words**] macrophage migration inhibitory factor (MIF); monoclonal antibody; sepsis

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02A247). Corresponding author: Li Shuhui, Tel: 86-23-68753761, E-mail: lisilei009@yahoo.com.cn; Wan Ying, Tel: 86-23-68752346, E-mail: wanying.cn@gmail.com

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2006AA02A247)
[通信作者] 李淑慧,电话:(023)68753761,E-mail: lisilei009@yahoo.com.cn
万 瑛,电话:(023)68752346,E-mail: wanying.cn@gmail.com

脓毒症是由严重感染免疫应答所导致的复杂的全身性炎症反应综合征,因为其高死亡率而一直被人们所重视。近年来,随着研究的不断进展,越来越多的脓毒症相关因子被发现[1-2]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是由巨噬细胞、T细胞、脑垂体释放的一种重要的促炎症因子,能通过多种途径促进机体的免疫应答以及炎症反应,其表达程度与脓毒症的发生、发展密切相关[3-4]。已有研究证实,阻断MIF生物学活性对于脓毒症模型动物具有明显保护作用[5-6]。而MIF生物学活性受其互变异构酶活性影响,据Al-Abed等[7]研究报道,利用小分子化合物阻断MIF异构酶活性能显著提高脓毒症小鼠的生存率。由此,在本室前期制备了具有生物学活性的重组hMIF的基础上[8],本实验对所制备的抗MIF单克隆抗体进行了特异性及生物学活性鉴定,并通过动物实验研究抗体对脓毒症的拮抗作用,以期找到具有脓毒症保护效果的单克隆抗体,为进一步研制针对脓毒症的治疗性抗体药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

具有生物学活性的重组hMIF及抗MIF单克隆抗体由本室制备[8-9];RAW264.7细胞系(小鼠巨噬细胞)购自中国科学院;DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司)、脂多糖(LPS,Sigma公司)、L-3, 4-二羟基苯丙氨酸甲酯(Sigma公司)、小鼠单克隆抗体(mIgG,Sigma公司)、单克隆抗体亚类检测试剂盒(Sigma公司)购自北京鼎国生物公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠抗体、免疫组织化学试剂盒(货号SP9002)购自北京中杉公司;Western blot底物液购自Milipore公司,显影液购自日本KODAK公司;高碘酸钠为国产分析纯,购自本校; NO检测试剂盒购自Fluka公司;小鼠血清TNF-α、IL-6检测试剂盒购自北京欣博盛公司。

1.2 实验动物

8周龄C57BL/6J雌性小鼠(体质量18~20 g)300只购自本校实验动物中心,饲养于SPF级实验室。

1.3 抗体亚类及亲和力测定

单克隆抗体亚类检测试剂盒购Sigma公司,按说明书操作。亲和力常数Ka通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定,根据公式 $Ka=(n-1)/2(n[Ab']-[Ab])$ 计算得出($n=[Ag]/[Ag']$,[Ab]、[Ab']为相应抗原浓度下,达到最大光密度值一半时的抗体浓度)[10-11]。

1.4 Western blot

重组MIF、Trx-MIF蛋白及PET-11b、PET-32a质粒表达蛋白进行7.5%凝胶电泳后转移至PVDF膜,1∶1 000稀释mIgG抗体及F11抗体4℃孵育过夜,mIgG抗体为阴性对照,HRP标记羊抗鼠抗体作为二抗室温孵育1 h。

1.5 免疫细胞化学及免疫组织化学

调整Raw264.7细胞数为1×10^5/ml,DMEM完全培养基培养24 h后用4%多聚甲醛固定于载玻片上,mIgG抗体为阴性对照。分别活取C57BL/6J正常小鼠及盲肠结扎穿孔(caecal ligation and puncture,CLP)模型小鼠肺组织制备切片,抗体F11作为一抗,正常小鼠肺组织(Sham)为阴性对照。试验所需二抗、封闭液、底物液等来自北京中杉公司免疫组织化学试剂盒,按说明书操作。

1.6 一氧化氮(NO)释放试验

将24孔板中Raw264.7细胞数调整至1×10^5/ml,DMEM完全培养基培养24 h改用去酚红无血清DMEM培养基,分别加入PBS、hMIF、hMIF + F11、hMIF + mIgG(终浓度30 μg/ml),PBS为空白对照,培养12 h后用NO检测试剂盒检测培养上清中的$NaNO_2$浓度,按试剂盒说明书操作。

1.7 MIF互变异构酶的活性的测定

37℃水浴共孵育hMIF与抗体15 min,4 mmol/L L-3, 4-二羟基苯丙氨酸甲酯、20 mmol/L高碘酸钠、1 mmol/L EDTA(pH=6.2)新鲜配制酶活性检测液, 475 nm处检测吸光度值的下降[12],实验重复3次。

1.8 CLP模型的建立及生存率、抗体量效关系试验

C57BL/6小鼠随机分为4组:假手术组(Sham组,5只)、CLP模型组(18只)、mIgG组(10只)、抗MIF抗体组(F11组,18只)。Sham组只做腹部的切开与缝合;CLP组、mIgG组、抗体F11组行盲肠结扎穿孔手术[13];术后0、6 h经腹腔注射给药,分别给予等体积的生理盐水、mIgG(7.5 mg/kg)、抗体F11(7.5 mg/kg),观察120 h内小鼠存活状况。抗体量效关系试验,CLP模型小鼠分为5组,分别给予生理盐水、2.5、5、7.5、10 mg/kg的F11抗体,腹腔注射给药,观察120 h内小鼠存活状况,绘制生存曲线图。

1.9 LPS模型的建立及生存率试验

C57BL/6小鼠随机分为4组: Sham组、LPS模型组、mIgG组、F11组。Sham组5只,腹腔注射生理盐水;其余组每组各10只,腹腔注射LPS溶液(25 mg/kg),同时分别给予等体积的生理盐水、mIgG(7.5 mg/kg)、抗体F11(7.5 mg/kg),观察小鼠24 h内存活状况。

1.10 小鼠血清TNF-α、IL-6检测

C57BL/6小鼠随机分为4组: Sham组、CLP模型组、mIgG组、F11组,分别于0、4、6、8、12 h摘眼球取血(每时相点各取3只),按试剂盒说明书操作检测血清TNF-α、IL-6浓度,实验重复3次。

1.11 统计学分析

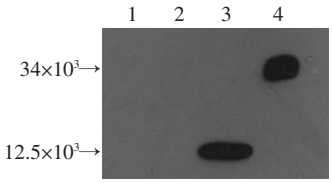
运用SPSS 18.0统计分析软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,显著性差异采用t检验,生存率采用Kaplan-Meier log-rank test分析。

2 结果

2.1 抗MIF单克隆抗体的鉴定

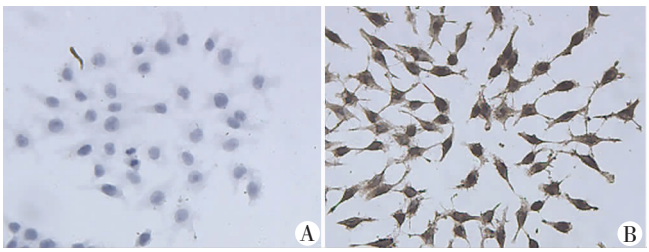
抗MIF单克隆抗体F11的亚类为IgG1型,抗体亲和力为2.5×10^{10}。Western blot显示F11抗体与重组hMIF、Trx-MIF蛋白结合为强阳性,与PET11b、PET32a质粒表达蛋白结合为阴性

(图 1);细胞免疫化学显示 F11 抗体与 Raw364.7 细胞结合为强阳性(图 2);免疫组织化学显示 F11 与正常小鼠肺组织结合为阴性(图 3A),与 CLP 模型小鼠肺组织结合为阳性(图 3B)。



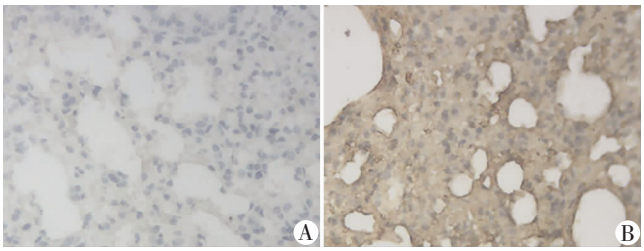
1:PET32a;2:PET11b;3:MIF/PET11b;4:Trx-MIF/PET32a

图 1　抗体 F11 的 Western blot 鉴定



A:mIgG 无关抗体;B:F11 抗体

图 2　抗体 F11 的细胞免疫化学鉴定　(S-P ×400)



A:正常小鼠肺组织;B:CLP 小鼠肺组织

图 3　抗体 F11 的免疫组织化学鉴定　(S-P ×400)

2.2　抗 MIF 单克隆抗体抑制 Raw264.7 细胞释放 NO

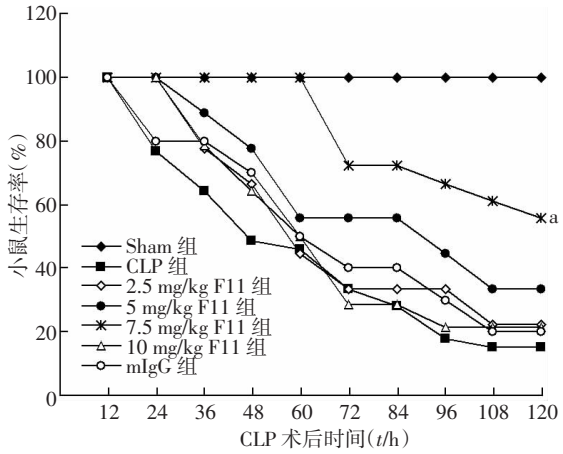
取 30 μg/ml hMIF、hMIF + F11、hMIF + mIgG 分别刺激 Raw264.7 细胞 12 h,用 NO 检测试剂盒测定培养上清中 $NaNO_2$ 浓度。未刺激 Raw264.7 细胞培养上清中 $NaNO_2$ 浓度为(2.52 ± 1.07)μmol/L;经 hMIF 刺激 Raw264.7 细胞培养上清中浓度为(38.93 ± 4.11)μmol/L;无关 mIgG 抗体处理的 hMIF 刺激后培养上清 $NaNO_2$ 浓度为(33.88 ± 4.79)μmol/L,与 hMIF 相比 NO 释放量无明显差异;F11 抗体处理的 hMIF 刺激后培养上清中 $NaNO_2$ 浓度为(17.65 ± 5.60)μmol/L,与 hMIF 相比明显抑制 Raw264.7 细胞释放 NO($P<0.01$)。

2.3　抗 MIF 单克隆抗体抑制 MIF 异构酶活性

浓度为 1、1.5、2、3 μg/ml 的 F11 抗体分别与 1 μg/ml hMIF 共孵育,0.7 ml PBS、hMIF 或 hMIF + F11 共孵育物分别与 0.3 ml 新鲜配制酶活性检测液反应,检测 475 nm 处光密度值的下降。PBS 为空白对照,MIF 为阳性对照。以 MIF 异构酶活性为 100%,计算其余各组的酶活性百分比。mIgG 组酶活性为 MIF 组的(87.88 ± 10.37)%,无显著差异;MIF + F11 各组酶活性分别为(20.24 ± 5.00)%、(4.57 ± 3.32)%、(3.78 ± 2.22)%、(4.73 ± 2.19)%,明显抑制了 MIF 异构酶活性($P<0.01$)。当 F11 抗体浓度为 1.5 μg/ml 时抑制效果比 1 μg/ml 时更明显,而浓度高于 1.5 μg/ml 时抑制效果不再增强。

2.4　抗 MIF 单克隆抗体对 CLP 致脓毒症小鼠的保护作用

各组 120 h 内小鼠存活状况见图 4。Sham 组小鼠全部存活,CLP 组、mIgG 组和 F11 组小鼠存活率分别为 15.4%、20.0%、55.6%,与 CLP 组相比,F11 组小鼠存活率显著提高($P<0.01$)。CLP 模型小鼠分别给予 2.5、5.0、7.5、10.0 mg/kg 的 F11 抗体,观察 120 h 内小鼠存活状况,绘制生存曲线图(图 4),F11 组按给药浓度从小到大,小鼠存活率依次为 22.2%、33.3%、55.6%、21.4%。抗体浓度为 7.5 mg/kg 时显著提高 CLP 小鼠存活率($P<0.01$),低于此浓度时,抗体对脓毒症小鼠的保护作用呈剂量依赖关系。抗体浓度为 10 mg/kg 时对脓毒症小鼠保护作用明显下降。

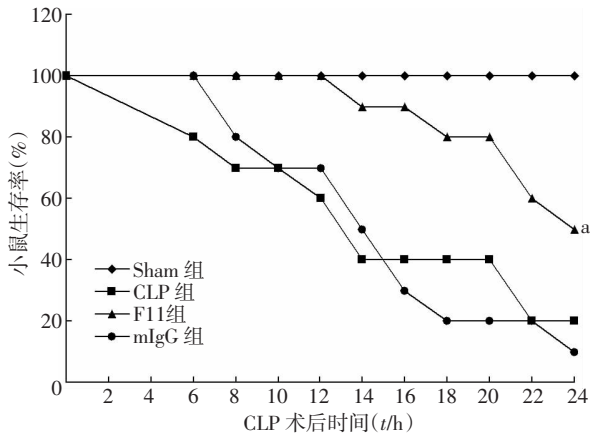


a:$P<0.01$,与 CLP 组比较

图 4　F11 抗体浓度与脓毒症保护作用的关系

2.5　抗 MIF 单克隆抗体对 LPS 致脓毒症小鼠的保护作用

各组 24 h 内小鼠存活状况见图 5。Sham 组小鼠全部存活,LPS 组、mIgG 组和 F11 组小鼠存活率分别为 20.0%、10.0%、50.0%,与 LPS 组相比,F11 组小鼠存活率提高($P<0.05$)。



a:$P<0.01$,与 CLP 组比较

图 5　F11 抗体对 LPS 小鼠生存率的影响

2.6 抗MIF单克隆抗体对CLP致脓毒症小鼠血清TNF-α、IL-6浓度的影响

CLP小鼠血清TNF-α水平于术后6 h达到高峰，然后回降。F11组小鼠血清TNF-α水平升高趋势与CLP组一致，但在4 h（$P<0.01$）、6 h（$P<0.05$）两个时相点升高程度明显低于CLP组（表1）。CLP小鼠血清IL-6水平于术后12 h达到高峰，F11组小鼠血清IL-6水平以同样趋势升高，但其升高程度在4、6、12 h明显低于CLP组（$P<0.01$）（表1）。

表1 F11抗体对CLP致脓毒症小鼠血清TNF-α、IL-6浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，每时相点每组取3只）

组别	时间（h）	TNF-α（pg/ml）	IL-6（pg/ml）
Sham	0 h	1.31±0.42	53.21±16.53
CLP组	0 h	2.00±0.40	57.33±17.21
	4 h	26.17±1.66	509.23±89.77
	6 h	68.70±13.97	1 461.93±191.77
	8 h	41.87±10.40	2 037.93±935.94
	12 h	24.77±10.80	6 593.87±207.85
mIgG组	0 h	1.92±0.75	55.70±15.21
	4 h	23.67±6.62	458.26±89.77
	6 h	67.87±9.73	1 303.30±176.60
	8 h	40.32±9.44	2 139.30±835.94
	12 h	22.47±8.80	6 359.30±197.85
F11组	0 h	1.78±1.50	54.67±11.15
	4 h	15.53±2.74[a]	138.87±93.75[a]
	6 h	35.97±11.16[b]	487.40±221.47[a]
	8 h	28.13±8.09	1 739.07±869.87
	12 h	16.53±3.18	3 226.60±807.29[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与CLP组比较

3 讨论

一直以来，脓毒症作为高死亡率的全身性炎症反应综合征严重威胁着人类健康。通过研究，人们已经发现多种炎症细胞因子的过度升高与脓毒症密切相关，如TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等。于是研究者们尝试运用TNF-α拮抗剂、IL-1受体抑制剂、缓激肽拮抗剂等传统炎症因子拮抗剂治疗脓毒症患者，但是并没有收到良好的效果[14]。因此，寻找新的脓毒症相关因子具有重要意义。

近年来，MIF作为一个重要的内在免疫应答调节因子以及早期炎症因子越来越引起研究者的注意。不断有文献报道，MIF在脓毒症患者血清中的表达明显增加，抑制MIF的表达能明显提高脓毒症模型小鼠的生存率，并且降低脓毒症小鼠血清中TNF-α、IL-1、IL-6等细胞因子的浓度[5-6]。研究者还发现，MIF蛋白的N端具有互变异构酶相似结构，因此MIF也具有互变异构酶活性，用小分子化合物抑制此互变异构酶活性能明显降低MIF蛋白的生物活性并且提高脓毒症小鼠的生存率[7]。MIF已经成为了新的潜在的脓毒症治疗靶点被研究者所重视。本室一直以来从事抗脓毒症单克隆抗体药物的研究，在前期工作中制备了具有生物学活性的hMIF蛋白以及IgG型抗MIF单克隆抗体。在本实验中，对MIF单克隆抗体的特异性和亲和力进行了鉴定，通过NO释放抑制试验和互变异构酶活性抑制试验筛选得到了具有生物学活性的高特异性、高亲和力抗体株F11，并且构建脓毒症模型小鼠研究此株抗体的抗脓毒症效用。

细菌LPS是已知的致脓毒症重要因素之一，CLP模型是公认急性重度脓毒症动物模型，因此本实验构建了LPS和CLP致脓毒症模型小鼠，研究F11抗体的抗脓毒症作用。在CLP模型中，F11抗体具有显著保护作用（$P<0.01$），特别是术后72 h之内CLP小鼠生存率达到100%，而在84～96 h时间段，小鼠生存率出现明显下降。由于MIF是一个早期炎症因子，我们猜测此现象可能与晚期炎症因子，如HMGB1等的出现有关。在LPS模型中，F11抗体也表现出明显保护作用（$P<0.05$），14 h之内小鼠存活率为100%，24 h时小鼠存活率为50%（LPS组小鼠存活率为10%）。实验还显示，F11抗体的剂量-效用关系呈钟形，即在低浓度时，保护作用随抗体浓度增高而增强，当抗体浓度较高时（10 mg/kg）保护作用反而明显下降。我们推测，这一现象可能与抗体Fc段介导的细胞杀伤作用有关。同时，我们在预实验中发现，不同给药方式对抗体保护作用有影响。我们在预实验中选择了CLP术后0 h给药，术后0、6 h给药，术后0、12 h给药，术后0、4、8、24 h给药4种方案。术后只给药一次小鼠48 h内存活率为100%，48 h后开始下降；术后0、6 h两次给药则小鼠全部存活的时间延长至72 h；当第2次给药时间推迟至术后12 h则保护作用与给药1次的效果近似；当48 h内的给药次数增加至4次，小鼠48 h存活率反而下降。我们推测，由于抗体在小鼠体内的降解作用，给药次数过少或间隔时间过长可以在短时间内发挥保护作用但是难以维持长时间的高保护作用，而给药次数过多则导致过度的免疫反应加重机体损伤导致动物死亡。

通过本实验，我们找到了具有脓毒症保护作用的高特异性、高亲和力IgG型单克隆抗体，为进一步研究抗脓毒症抗体药物奠定了基础。在后续实验中，我们将对抗体进行Fab片段化改造，降低Fc段介导的杀伤作用，并降低抗体降解速率，提高抗体的远期保护效果。

参考文献：

[1] Dellinger R P, Levy M M, Carlet J M, *et al*. Surviving Sepsis Cam-

paign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008[J]. Intensive Care Med, 2008, 34(1): 17 - 60.
[2] 伏建峰, 何新建. 脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 66 - 68.
[3] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R A, *et al*. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia[J]. Nature, 1993, 365(6448): 756 - 759.
[4] Ohkawara T, Mitsuyama K, Takeda H, *et al*. Lack of macrophage migration inhibitory factor suppresses innate immune response in murine dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. Scand J Gastroenterol, 2008, 43(12): 1497 - 1504.
[5] Calandra T, Echtenacher B, Roy D L, *et al*. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor[J]. Nat Med, 2000, 6(2): 164 - 170.
[6] Zhou H, Wang Y, Wang W, *et al*. Generation of monoclonal antibodies against highly conserved antigens[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e6087.
[7] Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, *et al*. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36541 - 36544.
[8] 倪敏, 易维京, 张阳, 等. 功能性重组人巨噬细胞移动抑制因子(hMIF)的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(4): 290 - 293, 298.
[9] 郭建秀, 李鹏, 伍艳芳, 等. 抗人 MIF 单克隆抗体的制备及其活性的初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 546 - 549.
[10] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1/2): 173 - 179.
[11] Loomans E E, Roelen A J, Van-Damme H S, *et al*. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207 - 217.
[12] Baker C C, Chaudry I H, Gaines H O, *et al*. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model[J]. Surgery, 1983, 94(2): 331 - 335.
[13] Marschall J C, Creery D M. Pre-clinical models of sepsis[J]. Sepsis, 1998, 2(3): 187 - 197.
[14] Russell J A. Management of sepsis[J]. N Engl J Med, 2006, 355(16): 1699 - 1713.

(**收稿**:2011-09-16;**修回**:2011-10-26)
(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2012)03-0191-01

个案与短篇

36 例开放性喉外伤的临床救治分析

贺 勇,殷 鹏,于 琨 (257034 山东 东营,胜利油田中心医院耳鼻喉科)

[**关键词**] 开放性喉外伤;创伤;治疗
[**中图法分类号**] R653 [**文献标志码**] B

开放性喉外伤是耳鼻喉科急诊,常伴有大出血、呼吸困难、休克症状,若处理不当常危及生命。我科 1995 - 2010 年共收治开放性喉外伤患者 36 例,效果较好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

36 例伤者中,男性 20 例,女性 16 例,年龄 21 ~ 56 岁。致伤原因:自杀刎颈 9 例,车祸 17 例,斗殴伤 10 例,就诊时间 6 h 内 28 例,6 ~ 12 h 8 例。临床表现为呼吸困难、声音嘶哑、局部出血,声嘶、呛咳等。损伤部位:甲状舌骨膜 7 例,甲状软骨 12 例,环甲膜 5 例,喉多部位伤 12 例。

1.2 治疗方法

在急救过程中,应首先保持呼吸道通畅,清除口腔和气管中的血性痰液,20 例患者即刻行气管切开术,16 例患者行气管内插管保持呼吸道通畅,迅速建立静脉通道,补液输血。所有患者到手术室麻醉后行清创术。术中彻底止血,仔细检查喉部损伤情况,黏膜损伤范围、喉软骨有无破损,并给予仔细缝合修复。必要时喉腔置入喉模扩张,防止喉狭窄。置胃管,严格呼吸道管理,同时注意全身情况,加强支持疗法,全身有复合伤者请相关科室会诊治疗。

2 结果

36 例伤者中 1 例醉酒喉损伤窒息,虽经气管切开,但因窒息时间太长呼吸衰竭死亡。5 例发生休克,经补液、输血纠正休克无 1 例死亡。20 例行气管切开术,其中 15 例治疗期间拔管,2 例因甲状软骨、环状软骨损伤严重引发喉狭窄,未能拔出气管套管。术后发音通气功能恢复正常者 15 例,术后声带麻痹 1 例,声带肉芽 2 例,遗留程度不同的声嘶。

3 讨论

开放性喉损伤的治疗原则以挽救生命为主,迅速止血和保持呼吸道通畅是抢救成功的关键,同时尽可能恢复喉功能。开放性喉外伤多因血块和软组织移位阻塞呼吸道引起呼吸困难,

(下转 205 页)

[**通信作者**] 贺 勇,E-mail:heyong123@126.com