DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.006
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1711-03

论著

创面局部应用 CTLA4Ig 重组腺病毒延长异体皮移植存活期的临床应用

王锡华,吴 军,陈希炜,易绍萱,罗高兴,贺伟峰 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察创面局部应用 CTLA4Ig 重组腺病毒延长异体皮存活期的临床效果。方法 12例大面积烧伤切痂创面应用 CTLA4Ig 重组腺病毒自体微粒皮和异体皮移植。临床观察异体皮存活时间、微粒皮封闭创面情况、用 EP-Ⅰ型水蒸仪测定创面水分蒸发量及组织学观察。结果 创面应用 CTLA4Ig 重组腺病毒能显著延长异体皮移植物的成活期[对照组(16.9±3.7) d,实验组(25.6±5.5) d],淋巴细胞浸润较少,自体微粒皮移植创面愈合率明显增高;实验部位水分蒸发量保持较低水平,而对照部位于术后9 d逐渐升高。结论 局部应用 CTLA4Ig-重组腺病毒是一种有效延长烧伤创面异基因移植皮肤存活期的方法。

关键词:细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;烧伤;皮肤移植;免疫耐受;创面愈合
中图法分类号:R392.11;R622.1;R644 文献标识码:A

Clinical application of CTLA4Ig-adenovirus for prolonging survival time of allograft skin on burn wound

WANG Xi-hua, WU Jun, CHEN Xi-wei, YI Shao-xuan, LUO Gao-xing, HE Wei-feng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of CTLA4Ig-adenovirus on prolonging survival time of allograft skin on the local burn wound. Methods In 12 patients with major burn, the Ad-CTLA4Ig cream prepared with 0.48% carbomer was applied on the wounds after escharectomy, and then the auto-microskin graft and allograft skin were transplanted on the wound. The survival time, wound healing area by auto-microskin grafting, the evaporative water loss (EWL) through wound coverings, and the histological changes were observed. The control sites were not applied with the cream. Results Local administration of CTLA4Ig-adenovirus cream could prolong the survival time of alloskin graft on burn wound significantly [(16.9±3.7) d *vs* (25.6±5.5) d, $P<0.01$]. Wound healing rate by auto-microskin grafting in experimental sites was significantly higher (82.4%±14.2%) than that in the control sites (54.4%±19.7%). The EWL on experimental sites remained a low level, but EWL on the control sites increased gradually from the 9th day after operation. Lymphocyte infiltration of the allograft skin in the experimental sites was more serious than that in the control sites. Conclusion Local administration of Ad-CTLA4Ig is an effective and easy protocol for prolonging the survival time of alloskin graft on burn wound.

Key words: CTLA4Ig; burn; skin transplantation; immune tolerance; wound healing

如何及时有效地覆盖、封闭创面,重建或恢复皮肤屏障是烧伤治疗的最终目标。除自体皮肤外,异基因(异体、异种)移植皮肤是烧伤创面最佳覆盖物,异体皮虽能暂时有效地覆盖封闭创面,但在较短时间内被排斥。如能延长异体皮在烧伤创面上的成活期,烧伤治疗水平将得到极大提高。CTLA4Ig 是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)与 IgG Fc 段的基因重组融合蛋白,可阻断抗原特异性T细胞活化过程起重要作用的 B7-CD28 共刺激通路,从而导致这类T细胞的无能或凋亡,对控制器官移植排斥反应的发生具有重要作用。我们实验室构建的 CTLA4Ig 动物实验证实可明显延迟心、肾、皮肤等器官移植的排斥反应[1~6]。为更方便地将 CTLA4Ig 应用于烧伤异体皮移植中,本实验室制成了 CTLA4Ig 重组腺病毒霜,动物实验表明显著地延长了小

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39934302);国家自然科学基金资助面上项目(39970756)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39934302) and the General Program of the National Natural Science Foundation of China (39970756)
作者简介:王锡华(1966-),男,浙江省武义县人,博士研究生,副主任医师,主要从事烧伤临床方面的研究。电话:(023)68754148-8051
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2003-07-21;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

鼠异基因皮肤移植的成活期[6]，在本研究中将CTLA4Ig重组腺病毒霜应用于临床，以观察疗效。

1 材料与方法

1.1 CTLA4Ig重组腺病毒霜剂的来源及制备

CTLA4Ig重组腺病毒霜剂由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供，批号为：国药管械(新)2002第3460001号。具体的制备为：称取0.48 g医用霜剂基质卡波姆装入50 ml塑料离心管中，应用^{60}Co辐射消毒后，加入1×10^9 PFU/ml CTLA4Ig重组腺病毒液40 ml，混匀器混匀，并用Tris 1 mol/L，pH 9.0调至7.0。存于4 ℃备用。

1.2 临床资料

本组12例均来自于兰州军区乌鲁木齐总医院烧伤整形科，均为男性，年龄24～41岁，火焰烧伤10例，热液烫伤2例，烧伤总面积72%～91%(83.5%±6.6%)，Ⅲ度面积50%～82%(67.3%±11.8%)；于伤后2～5 d，平均3.8 d，行四肢Ⅲ度切痂，自体微粒皮移植(1∶15)＋异体皮移植10例，单纯异体皮移植2例。创面上涂CTLA4Ig重组腺病毒霜剂，厚度2 mm，面积为1%～5%(1.9%±0.8%)，未涂CTLA4Ig重组腺病毒霜剂的创面为对照。以上异体皮均为液氮保存的人尸体皮。

1.3 观察指标

1.3.1 异体皮在烧伤创面上的成活时间 以移植异体皮后皮肤转红直到皮肤坏死变硬变黑视为排斥。以到移植异体皮90%变硬变黑时的时间为排斥时间。

1.3.2 异体皮下自体微粒皮移植创面愈合率 异体皮在创面上较长时间的成活为移植微粒皮的生长、扩展提供最佳微环境。于异体皮从创面上分离脱落后观察微粒皮的生长、扩展及封闭创面情况，以封闭愈合创面占总创面的百分比为自体微粒皮移植创面愈合率。

1.3.3 创面水分蒸发量的测定 利用EP-Ⅰ型水蒸仪(servomed evaporimeter EP-Ⅰ型，瑞典)每日测定实验部位与对照部位的创面水分蒸发量。

1.3.4 组织学检查 于术后两周取异体皮活检，HE染色光镜检查。

1.3.5 心肝肾功能检查 每周常规采血用全自动生化分析仪(dimension clinical chemistry system，XI，DU PONT，USA)进行血生化检查，包括血清磷酸肌酸激酶(CK)、血清谷丙转氨酶(ALT)、血清谷草转氨酶(AST)、血浆尿素氮(BUN)、血浆肌酐(Cr)。

1.4 统计学处理

计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPLM统计包进行方差分析。

2 结果

2.1 异体皮成活期及自体微粒皮愈合率

创面应用CTLA4Ig重组腺病毒霜能显著延长异体皮移植物的成活期，平均存活时间由对照组的(16.9±3.7) d延长至(25.6±5.5) d，其中最长存活时间长达32 d。应用CTLA4Ig重组腺病毒霜的实验部位异体皮仍与创面粘附良好，大部分未被排斥；而未应用CTLA4Ig重组腺病毒霜的对照部位异体皮完全排斥，从创面上基本脱落。同样，异体皮下自体微粒皮移植创面愈合率实验部位明显高于对照部位($P<0.01$)。

2.2 创面水分蒸发量的变化

切痂异体皮移植后创面水分蒸发量可明显下降，实验部位创面水分蒸发量一直维持较低水平，而对照部位于术后9 d开始逐步升高，至术后17 d达到高峰，以后略有下降趋势(图1)。

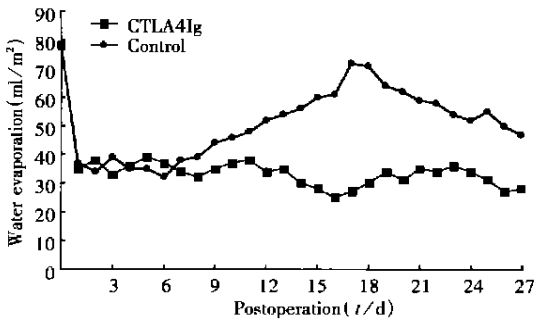


图1 创面水蒸发量的变化

Fig 1 Changes of water evaporation losses from wound

2.3 移植皮肤组织学检查

术后2周对照组移植异体皮肤切片，见大部分表皮分离、脱落，真皮坏死、溶解，大量炎细胞浸润。实验组表皮真皮结构较完整，真皮内有毛细血管长入，炎性细胞浸润较少。

2.4 心、肝、肾功能的变化(表1)

严重烧伤后本身对心、肝、肾功能有影响，术前CK、ALT、AST、Cr均高于正常值，随着切痂后病程的发展，血中CK、ALT、AST、Cr及BUN逐渐降至正常范围内，提示应用CTLA4Ig重组腺病毒霜对心、肝、肾功能无显明损伤($P>0.05$)。

表1 CTLA4Ig重组腺病毒霜对烧伤病人心、肝、肾功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of CTLA4Ig-adenovirus cream on the functions of heart, liver, and kidney in burns patients ($\bar{x}\pm s$)

Time after burn (week)	n	CK (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
1	12	261.3±44.3	98.0±21.2	95.3±49.2	6.2±2.8	141.4±42.4
2	12	147.1±29.0	47.4±16.1	61.2±25.4	5.7±2.4	97.1±21.0
3	12	95.0±22.4	35.3±19.4	43.2±13.4	4.4±1.0	103.3±16.0
4	12	99.4±25.1	24.0±12.3	26.0±11.1	3.9±2.2	92.0±18.1
5	12	78.4±19.1	28.2±10.0	27.0±8.0	3.4±1.5	106.1±13.4
6	12	88.2±14.0	26.2±8.1	21.1±9.3	2.9±1.8	82.3±8.2

3 讨论

烧伤的根本问题是创面问题。大面积深度烧伤创面和焦痂的存在造成了机体体液大量的丢失，而且是多种有害介质释放及导致全身侵袭性感染的滋生地，也是引发机体超高代谢及多种器官功能衰竭的重要原因。因此，临床上尽早切痂后自体微粒＋大张异体皮移植已

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成为当今烧伤治疗领域的成功经验。然而, 异体皮肤由于免疫排斥反应而坏死脱落、创面感染, 从而严重影响了自体皮肤的进一步生长、扩展, 使治疗效果受到极大限制。而应用免疫抑制剂虽能有效地减弱排斥反应的发生, 延长移植物存活, 但极易诱发因烧伤后本身机体免疫功能低下的烧伤病人发生严重的全身感染。

研究表明, 异体(种)皮肤移植物后的排斥反应主要是急性细胞性排斥反应, 活化的 T 淋巴细胞在其中起着主导性作用, T 细胞的完全活化须同时存在 TCR 对 MHC-抗原肽复合物的识别以及辅助刺激信号的刺激, 当缺少或阻断 T 细胞的辅助刺激信号, 将导致 T 细胞无反应(anergy)、细胞凋亡(apoptosis)或克隆丢失(clone depletion), 从而诱导免疫耐受的发生。迄今已在 T 细胞活化过程中发现多种辅助刺激信号系统, B7/CD28 途径是 T 细胞活化中最重要的辅助信号途径[7]。CTLA4Ig 是细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA4)与 IgG Fc 段的基因重组融合蛋白, 可阻断抗原特异性 T 细胞活化过程起重要作用的 B7-CD28 共刺激通路, 从而导致这类 T 细胞的无能或凋亡[8]。我们实验室已构建了 CTLA4Ig, 动物实验证实全身应用 CTLA4Ig 可明显延迟心、肾、皮肤等器官移植的排斥反应[1~6]。但如何将溶液中的 CTLA4Ig 重组腺病毒载体(Ad-CTLA4Ig)应用到烧伤创面及待移植皮肤真皮面是必须克服的另一难题。我们在实验中选用药用软膏基质卡波姆固定 Ad-CTLA4Ig。实验证明卡波姆并不影响 Ad-CTLA4Ig 对细胞的感染及活性, 局部应用使小鼠烧伤创面异基因移植皮肤存活期大幅度延长[9]。本组临床应用资料同样表明局部上涂 CTLA4Ig 重组腺病毒霜剂明显延长异体皮移植物的存活期, 组织学检查结果提示应用 CTLA4Ig 重组腺病毒霜剂的异体皮淋巴浸润少, 排斥反应轻。由于异体皮较长时间的在创面上成活, 提供一个利于微粒皮生长、创面愈合的良好环境, 使微粒皮封闭创面的有效率明显提高; 同时创面不直接裸露, 有效地阻止了水分从创面的蒸发。创面水分的蒸发是引起超高代谢、能量消耗的原因之一。而局部 CTLA4Ig 重组腺病毒霜对烧伤病人的心肝肾功能没有明显的影响, 表明局部应用 CTLA4Ig 重组腺病毒霜延长异体皮在创面上的存活期是安全有效的。

参考文献:

[1] 易绍萱, 吴　军, 姜　庆, 等. 人 CTLA-4 胞外区 cDNA 的克隆及 Ig 融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9): 834－837.

[2] 易绍萱, 吴　军, 王锡华, 等. CTLA-4/Ig 融合蛋白在 COS-7 中的表达、纯化及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 523－526.

[3] 姜　庆, 方玉华, 吴　军, 等. CTLA4 Ig 在诱导小鼠心脏移植免疫耐受中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(11): 1050－1052.

[4] 黄赤兵, 吴　军, 易绍萱, 等. 基因重组融合蛋白 B7-CD28 共刺激阻断剂对大鼠移植肾存活的影响[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(7): 553－555.

[5] 杨世昕, 吴　军, 卞修武, 等. CTIA4Ig 基因表达对鼠皮肤移植免疫抑制作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 759－761.

[6] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱, 等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37－39.

[7] Wingren A G, Parra E, Varga M, *et al*. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles[J]. Crit Rev Immunol, 1995, 15(3-4): 235－253.

[8] Najafian N, Sayegh M H. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9(9): 2147－2157.

(编辑　张　宁)

(上接 1707 页)

穿刺脑脊液培养证实为椎管内感染, 经积极抢救, 椎管内注射药物, 应用抗生素激素治疗, 患者昏迷 2 d 后清醒, 半个月后治愈出院。Spangfort[1] 报道 2 500 例腰椎间盘手术感染率为 3.2%, 严重感染占 0.6%, 并认为此类患者不宜采用头低脚高位, 以及局部压迫的方法, 应及时切开修补漏口, 预防感染。

术后切口窦道形成, 本组 2 例患者均为中年肥胖女性, 术中行皮下脂肪切除, 两侧骶棘肌剥离较广, 术后切口先出现脂肪液化, 后逐渐形成腔隙而经久不愈, 经 1 个半月的引流、换药、扩创后结痂愈合, 未出现深部感染及其它并发症。

术后出现大小便障碍, 会阴部麻木, 本组 4 例患者术后半个月仍出现小便不能自解, 需保留导尿, 大便需定时灌肠, 每天肌注新斯的明 2 ml。其中 2 例考虑术中因椎间盘巨大, 神经根粘连严重, 在剥离神经根时过度牵拉或压迫硬脊膜所致。另两例术中发现椎前静脉曲张明显, 术中出血较多, 止血不彻底致填塞明胶海绵较多, 考虑为术后血肿压迫所致。发现症状后, 早期保留导尿、灌肠、后期定时放尿、膀胱训练、服用润肠通便及缓泻药物, 小便均可自解, 但有 2 例残余尿较多, 且次数较多。另有 2 例长期诉会阴部麻木, 4 例患者大便长期结燥。De Palma[2] 报道类似病例 12 例, 马尾神经综合征是腰椎间盘突出症的严重并发症。其中运动功能恢复较好, 括约肌功能障碍次之, 鞍区感觉恢复最慢, 性功能恢复最差。马尾神经受压致括约肌功能障碍大部分不能恢复。

关键词: 腰椎间盘突出症; 并发症

中图法分类号: R681.53　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Spangfort Ev. The lnmbar disc herniation. A computer-aided analysis of 2504 operations[J]. Acea Orthop Scand Suppl, 1970, 142: 1－95.

[2] De Palma L. Intradural lumbar disc hernia. Report of two cases[J]. Ital J Orthop Traumatol, 1976, 2: 421.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net