DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.012
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0949-05

论著

小鼠肥大细胞瘤P815特异抗原P1A的克隆与表达

倪 兵,吴玉章,唐 艳,邹丽云,万 瑛,赵建平 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆小鼠肥大细胞瘤P815细胞株的P1A基因以制备肿瘤DNA疫苗。方法 用RT-PCR方法制备P1A基因,以哺乳细胞高效表达质粒pCI-neo为载体,构建重组DNA疫苗。重组体用克隆位点上游和下游的T7和T3启动子序列为测序引物,用自动测序仪测序鉴定克隆的正确性。再将鉴定过的重组质粒用磷酸钙法转化293细胞,用RT-PCR法鉴定转化细胞中P1A基因的表达。结果 正确构建了P1A/pCI-neo重组质粒,并且在转化此质粒的293细胞中检测出了P1A的表达。结论 成功地构建了重组P1A/pCI-neo肿瘤疫苗,可以进行下一步的肿瘤动物模型的疫苗接种及疗效观察。

关键词:P1A;pCI-neo;RT-PCR;克隆;肥大细胞瘤
中图法分类号:R392.11;R394.2;R730.262 文献标识码:A

Cloning and expression of specific antigen P1A of mouse mastocytoma cell line P815

NI Bing, WU Yu-zhang, TANG Yan, ZHOU Li-yun, WAN Ying, ZHAO Jian-ping (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone P1A gene from mouse mastocytoma cell strain P815 for the production of tumor DNA vaccine. Methods P1A gene was prepared with RT-PCR and then ligated with the vector pCI-neo which having high efficient expression in mammals to construct a recombinant DNA vaccine. The recombinant was sequenced by automatic sequencer with promoters T7 in upstream and T3 in downstream as sequencing primers. After the identified recombinant plasmids were transformed into cell 293 with $Ca_3(PO_4)_2$, the expressions of P1A in the cells were determined with RT-PCR. Results The recombinant P1A/pCI-neo plasmid was constructed successfully and the expression of P1A gene could be detected in the transformed 293 cells. Conclusion Our experiments indicate that the recombinant P1A/pCI-neo tumor DNA vaccine can be constructed successfully which could be used for the studies of tumor animal model.

Key words: P1A; pCI-neo; RT-PCR; clone

近年来,随着肿瘤抗原鉴定方法学的进展,越来越多的肿瘤抗原在分子水平得以鉴定[1],其中,CT抗原(Cancer-testis antigens)由于在多种肿瘤组织中分布,更有希望发展出适用范围较广的肿瘤疫苗,故而倍受关注。小鼠肥大细胞瘤P815是应用较为广泛的一种肿瘤模型,该肿瘤模型已鉴定出至少5种不同的肿瘤抗原(P815A,B,C,D,E),其中P1A肿瘤抗原基因编码的CTL表位[2]目前已鉴定出,这种表位是一个九肽,即P815AB(30~43),含两个CTL表位($H\text{-}2L^d$)。另外,最近几年DNA疫苗的发展也取得了很大的发展,其中不乏肿瘤DNA疫苗,这些疫苗在一些动物模型中取得了令人鼓舞的结果[3]。因此,本研究拟以哺乳细胞高表达质粒pCI-neo为载体,用RT-PCR从小鼠肥大细胞瘤P815细胞株中制备P1A基因,再构建P1A-pCI重组质粒,以制备含CTL表位的全长小鼠肥大细胞瘤P815 DNA疫苗。期望利用DNA疫苗所表达的质粒主要通过MHC-I类途径呈递以及P815抗原含有CTL表位的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39700132)
作者简介:倪 兵(1968—),男,湖北省黄梅县人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤DNA疫苗方面的研究。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-21

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

特性，使专职 APCs 细胞内抗原提呈途径将重组 DNA 疫苗编码的 CTL 表位提呈给 CTLs，在小鼠肥大细胞瘤 P815 模型中取得良好的肿瘤免疫治疗作用；也期望它能在共享该抗原的其它肿瘤组织中发挥治疗作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养

P815 细胞：为 DBA/2 小鼠来源的肥大细胞瘤系，购于上海细胞所，采用 RPMI1640 加 10%热灭活小牛血清完全培养基，于 37 ℃、5%CO_2 孵育箱内常规培养。

1.2 试剂

Tripure、High Pure Plasmid Isolation Kit 购于 Roche 公司；AMV、核酸内切酶、连接酶、RNA 抑制剂及 polyoligo（dT）15 及质粒 pCI-neo 购于 Pomega 公司；Taq 酶及其缓冲液购于 PE 公司，dNTP 购于上海生物工程有限公司，所有引物均为该公司合成。

1.3 P815 细胞总 RNA 的提取

按购自 Roche 的 Tripure 试剂盒的说明书进行操作。过程简述如下：轻轻从培养瓶中倒出培养基，室温下将本试剂直接加入培养瓶中。吸管吸打数次，裂解液转入一聚丙烯离心管。加入氯仿，剧烈振荡 15 s。放置室温 2～15 min 后，离心使相分离。将水相转入一离心管中，加入异丙醇，颠倒数次以彻底混匀。室温放置 5～10 min 以利于沉淀形成。离心，弃上清。加入 75%乙醇，涡旋洗涤乙醇中的 RNA 沉淀。离心，弃上清。空干 RNA 沉淀，重悬 RNA 沉淀于 DEPC 处理过的无 RNA 酶水中，吸打溶解 RNA 沉淀，然后于 55～60 ℃中温育 10～15 min。紫外分光光度计上测定 A_{260}、A_{280}及其比值，并进行 RNA 的定量。然后置－20 ℃保存备用。

1.4 RT-PCR

1.4.1 总 RNA 与 poly（dT）15 退火 在 EP 管中加入 3 μg RNA 和 3 μl poly(dT)15(0.5 μg/μl)，加水至 15 μl。70 ℃ 10 min；然后 20 ℃放置 10 min。

1.4.2 逆转录反应 PCR 专用管中加入退火产物 15 μl，5× AMV buffer 8 μl，dNTP(10 mmol/L) 3 μl，RNA inhibitor 1 μl(40 U)，AMV 3 μl(30 U)，ddH_2O 10 μl。42 ℃放置 1 h。

1.4.3 PCR PCR 引物根据载体 pCI-neo 和 P1A 基因序列用 DNAStar 序列分析软件进行设计。上游引物为：5'-CGGAATTCACCCTTTGTGCCATGTCTGATAAC-3'；下游引物为：5'-GCTCTAGAACTTCTTCCGCTGTCCATTTCTTT-3'。上述黑体带下划线部分序列分别为 *EcoR* I 和 *Xba* I 的酶切位点。此两位点与 pCI-neo 上的相应多克隆位点相吻合。在 PCR 专用管中加入 $MgCl_2$（25 μmol/L）3 μl、10× buffer（无 $MgCl_2$） 5 μl、dNTPs（10 mmol/L）1 μl、上游引物 1 μl、下游引物 1 μl、Taq 酶（5 U/μl） 0.25 μl、模板 cDNA 3 μl、无核酸酶 ddH_2O 36.75 μl。95 ℃变性 5 min。94 ℃，1 min；50 ℃，2 min；72 ℃，1 min，共 35 个循环，最后一个循环，72 ℃延伸 10 min。然后置于 4℃终止反应并储存。

取部分产物与 Marker（λDNA/*Hind* III）于 1%琼脂糖凝胶上电泳，判断 PCR 产物的大小。

1.5 PCR 产物在 pCI 上的定向克隆

1.5.1 酚/氯仿抽提 PCR 产物 取 50 μl PCR 产物于 EP 管中，酚/氯仿抽提至界面看不到乳白色蛋白质沉淀，再用氯仿抽提两次。上清加 10 μl 3 mol/L NaAc（pH 5.2）和 2 倍冰冷无水乙醇，冰上沉淀 1 h。离心，弃上清，再用 70%乙醇洗涤沉淀。沉淀用 TE 溶解，4 ℃保存备用。

1.5.2 载体 pCI-neo 的扩增及抽提纯化 用 DMSO 法制备高效感受态大肠杆菌 DH5α，转化后铺 Amp 平板，37 ℃培养过夜。第 2 天取一个单克隆小规模培养，用 High Pure Plasmid Isolaton Kit 提取质粒。用 *EcoR* I 和 *Xba* I 分别进行酶切鉴定，再将鉴定过的质粒保存备用。

1.5.3 PCR 产物和载体 pCI-neo 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切及酶切产物的电泳回收 在 1%低熔点琼脂糖上电泳分离 PCR 产物，手术刀片切割下相应条带并置于 EP 管中。65 ℃化胶 5 min，冷却至室温。再分别用酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。再用 NH_4Ac 和冰冷乙醇沉淀 DNA 片段。70%乙醇洗涤，沉淀彻底空干，最后用 TE 溶解，4℃保存备用。紫外分光光度计上定量两种双酶切产物量。

1.5.4 连接及连接产物的转化扩增 按 1∶3（P1A∶pCI）的摩尔比混合，并于 16 ℃反应 12 h。置 70 ℃，10 min 以终止反应。取 2 μl 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定。将连接产物转化感受态 DH5α，Amp 平板筛选。取阳性单克隆进行扩增，并抽提出重组 P1A-pCI-neo 质粒。

1.5.5 重组质粒的鉴定 （1）酶切电泳鉴定：重组质粒分别用 *EcoR* I 和 *EcoR* V/*Xba* I 单、双酶切，然后在 1%琼脂糖凝胶上电泳鉴定。（2）插入片段及其两侧序列的测序鉴定：双向测序，上游测序引物为 T7 启动子（5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'），下游测序引物为 T3 启动子（5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'）。抽提的重组质粒寄送基康公司进行自动测序。

1.6 重组质粒转染 293 细胞

本实验采用磷酸钙法转染 293 细胞。在 6 cm 平板中接种细胞，细胞数量应以第 2 天产生 40%～60%汇合为准。第 2 天制备 DNA 混合物：在 TC 操作台上向 DNA 溶液中加灭菌水至 125 μl，再加 125 μl 0.5 mol/L $CaCl_2$。在 TC 操作台上竖放一根 14 ml 聚苯乙烯管，加入 250 μl，2× HBS，加入 DNA/$CaCl_2$ 混合液，混匀，放置 20 min。加混合物于平板中，轻轻摇动混匀，置培养箱中培养。24 h 后，吸出培养基，用 1× PBS 洗涤，再加 3 ml 含 G418（800 μg/ml）选择抗生素的新鲜培养基继续培养。以后每隔 3 d 换 1 次含此抗生素的培养基。第 13 天出现细胞克隆，然后 500 r/min 离心 10 min，收集细胞。1× PBS 洗涤两次，收集细胞备用。

1.7 转染重组质粒的 293 细胞中的 P1A 基因稳定表达鉴定

本实验采用 RT-PCR 法来确定 P1A 的 mRNA 水平稳定表达[4]。按照试剂使用说明，用 Tripure 试剂盒抽提已转化的 293 细胞总 RNA。为了纯化 RNA，在 Tripure 试剂所提取的总 RNA 溶液中加入无 RNA 酶的 DNase Ⅰ，终浓度为 2 μg/ml，37 ℃保温 60 min 以消化 DNA 分子。然后，再进行逆转录反应和 PCR 扩增。所用引物为：AB375（5'-ATGGGTGCTGGCGCTAACTGT-3'）及 AB376（5'-TCTTCTGGGCTTTGCAACTGC-3'）；对照β-actin 引物为：BLE7（5'-TGGCGCTTTTGACTCAGGGAT-3'）和 BLE8（5'-AGCCCTGGCTGCCTCAAC-3'）。PCR 反应条件为：94 ℃ 5 min 预变性，

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

94 ℃ 1 min, 65 ℃ 2 min, 72 ℃ 3 min, 35 个循环, 最后一个循环 72 ℃延伸 10 min。扩增完毕后, 取部分产物进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后用 0.5 μg/ml EB 染色 30 min, 确认目标 DNA 条带。为了进一步证实 PCR 扩增产物源于 P1A 基因, 用软琼脂回收 PCR 产物, 送基康公司测序。

2　结果

2.1　质粒 pCI-neo 的转化、抽提、扩增、酶切及低熔点琼脂糖凝胶回收结果

将质粒用 *EcoR* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ/ *BamH* Ⅰ、*Xba* Ⅰ/ *BamH* Ⅰ分别进行单、双酶切后, 1% 琼脂糖电泳的结果均与理论值相符, 即单酶切后均为一条带, 双酶切后均为两条带, 且 3 h 的酶切时间足够, 未见任何杂带, 证明质粒本身工作正常, 内切酶完全可以切开质粒。*EcoR* Ⅰ/ *Xba* Ⅰ双酶切物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收后, 琼脂糖电泳可见明显目标条带。紫外分光光度计测定结果为: A_{260}/ A_{280}为 1.78; 浓度为 0.945 μg/ml。

2.2　P815 细胞 P1A 基因的 RT-PCR 结果

Tripure 试剂盒抽提的总 RNA 紫外分光测定 A_{260}为 0.007, A_{280}为 0.015, A_{260}/ A_{280}为 2.1, RNA 纯度高。浓度为 0.375 μg/ml。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 可见清楚的 751 bp 的 P1A 条带和对照的β-actin 条带, P1A 条带的大小与理论值完全一样, 见图 1。

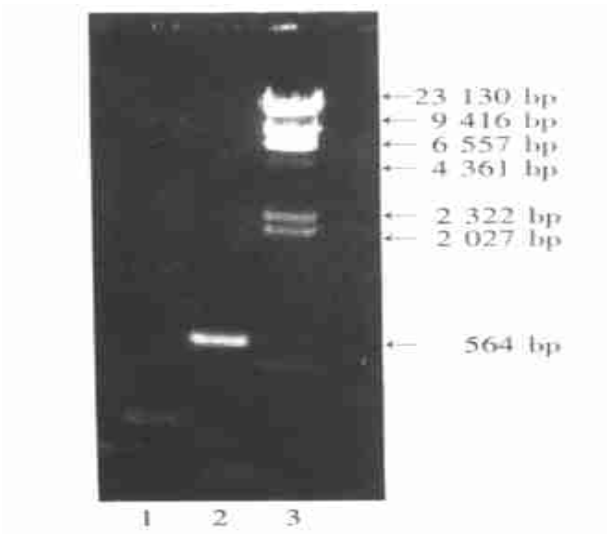


图 1　PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶的电泳结果

Fig 1　Result of PCR product in 1% agarose gel electrophoresis

1: β-actin; 2: PCR product of P1A; 3: Marker(λDNA/ *Hind* Ⅲ)

2.3　定向克隆结果

2.3.1　重组质粒筛选鉴定及重组质粒酶切鉴定结果　由于质粒及 P1A PCR 产物消化很彻底, 且克隆所使用的内切酶为两个不同的酶, 所以最后在 Amp 平板上可见分布均匀、形态大小均一的阳性单克隆细菌; 而对照平板上未见任何菌落生长。挑取阳性单克隆菌落, 扩增后用 High Pure 质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *EcoR* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ/ *Xba* Ⅰ单、双酶切, 所挑选的 5 个菌落的质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳显示质粒已完全切开, 呈一条(单酶切)或两条带(双酶切)。且载体的位置与 pCI 的 *EcoR* Ⅰ酶切物位置一致; 插入片段条带与 P1A PCR 产物的位置一致。另外利用空载体作相应的对照。从结果可以看出, 不管是酶切的和未酶切的重组质粒的分子量均高于空载体; 连接物的电泳结果也显示有大于线性空载体的条带。这些结果表明克隆已基本成功, 见图 2、3。

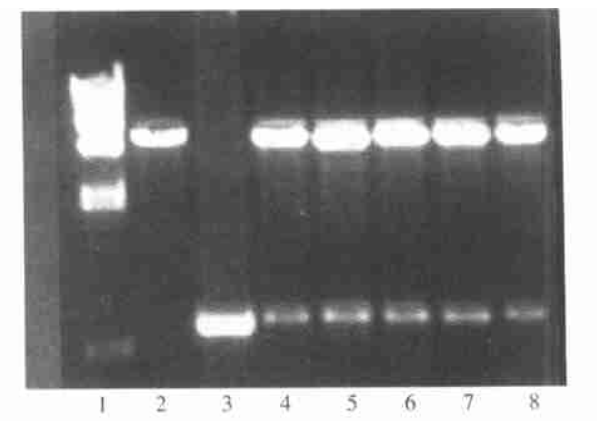


图 2　重组质粒 ***EcoR* Ⅰ/ *Xba* Ⅰ**双酶切在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 2　Restriction mapping of recombinant plasmid digested by *EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ and separated on 1% agarose gel

1: Marker (λDNA/ *Hind* Ⅲ); 2: Linear pCI (*EcoR* Ⅰ); 3: PCR product of P1A; 4～8: Product of recombinant plasmid digested by *EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ



图 3　重组质粒对照酶切图谱

Fig 3　Control restriction map of recombinant plasmid

1, 9: Marker (λDNA/ *Hind* Ⅲ); 2, 3: pCI; 4, 5: recombinant; 6: Linear pCI (*EcoR* Ⅰ); 7, 8: Linear recombinant plasmid(*EcoR* Ⅰ); 10: P1A PCR product; 11, 12: Digested product of recombinant (*EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ); 13: Product of ligation

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

2.3.2 重组质粒测序结果 重组质粒提取后寄送基康公司进行测序，采用克隆位点上游的T7启动子序列及下游的T3启动子序列作为测序引物进行双向测序，测序结果与理论值完全一致。

2.4 转染后的293细胞P1A表达结果

磷酸钙法转染后，293细胞生长良好。照上述方法进行RT-RCR后，PCR产物在12%聚丙烯酰胺凝胶上电泳，然后用0.5μg/ml EB水溶液染色，结果见图4；PCR产物仍寄送基康公司进行自动测序，测序结果与Genebank(NM 011635)中相应序列相吻合。

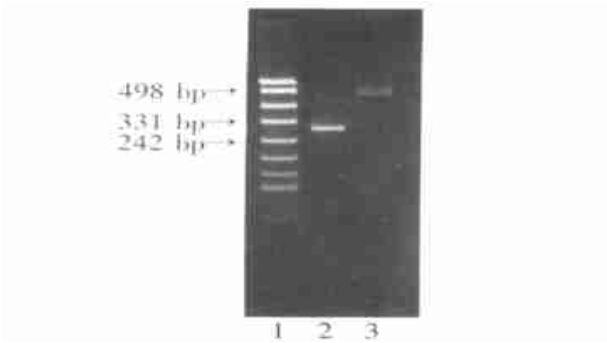


图4 PCR产物12%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig 4 Result of PCR product analyzed by 12% polyacrylamide gel electrophoresis

1: Marker; 2: PCR product; 3: β-actin

3 讨论

1957年，Dunn等首先用化学致癌剂甲基胆蒽在DBA/2系小鼠体内诱发产生P815系，其后该瘤系成为肿瘤免疫学领域常用的模型之一。自1980年以来，Boon主持的比利时Ludwig癌症研究所基于该肿瘤模型做了较为出色和系统的肿瘤免疫学研究。他们先后证实P815瘤系至少存在5种可被相应CTL克隆识别的肿瘤抗原(P815A、B、C、D、E)，并鉴定出这些肿瘤抗原的编码基因。P1A是目前已知小鼠肿瘤抗原中仅有的一个与人类肿瘤抗原MAGE基因家族表达相似的肿瘤抗原基因。该抗原是一个由异常激活的P1A基因编码的九肽(35～43)，其序列为LPYLGWLVF(H-2L^d)，其中包含P815A和P815B两个CTL表位，可同时被抗P815A和抗P815B的CTL克隆识别。但在某些肿瘤突变株，P1A基因发生点突变，使九肽中第42位缬氨酸变为丙氨酸，则该表位仅可被抗P815B的CTL克隆识别。现已证明，P1A基因可在肥大细胞瘤P815、浆细胞瘤J558、纤维肉瘤MethA等多种小鼠肿瘤中表达，而在正常组织中仅出现于睾丸、胎盘；在后两者中，P1A基因仅出现于无MHC分子表达的精原细胞和滋养层细胞，因而不会被相应CTL所识别。由于P1A基因表达分布与人类肿瘤抗原MAGE、GAGE、BAGE等基因家族相似，故而近年来对P815AB抗原的研究较为广泛，并成为一种设计和研究各种肿瘤疫苗方案的理想模型。另外，强力有效的免疫策略对一些疾病如感染性疾病和肿瘤等是迫切需要的，而传统传播途径和分子免疫途径到目前为止并没有取得太大的成功。最近关于不同T细胞亚群的作用的研究使得解决这个问题有了一个更加合理的途径。现在已知，对多种感染性疾病特别是病毒感染如HIV(Human immunodeficiency virus)的感染以及肿瘤的防治需要产生强有力的细胞介导的免疫反应(Cell-mediated immunity，CMI)。CMI反应一般由$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte，CTL)和Th1表型的$CD4^+$辅助T细胞(T helper，Th)所介导，两者各自表现出各种不同的功能效应。能产生强大的CMI的疫苗现在被认为在控制许多疾病包括HIV的感染和肿瘤方面有着美好的前景。

在这方面，DNA疫苗相对于以前的免疫策略有着强大的优势[5,6]：(1)易操作性和稳定性；(2)在体内持续表达，持续刺激免疫系统；(3)除了产生强有力T细胞免疫之外，体液免疫功能也较强，并且是抗原特异的中和抗体；(4)可方便地制备出多价DNA疫苗；(5)DNA疫苗在机体内所表达的蛋白将以天然蛋白形式出现；(6)当在质粒中整合入CKs(Cytokines)或共刺激分子基因，或与编码这一成分的质粒共注射时，将能加强随后机体对编码抗原的反应，或可调节正在起作用的免疫反应；(7)DNA疫苗风险小。既不会感染，目前也尚未发现其与宿主基因组的整合。DNA疫苗接种后，将直接转染体细胞和专职APCs，并可通过交叉激活途径激活CTLs[7]。

DNA疫苗本身也是一个非常强的Th1型佐剂。这对于需要强有力细胞免疫的疾病来说是非常必要的。因此，本研究构建了P1A/pCI-neo重组DNA疫苗，并证实了其在哺乳细胞293中可以较好地表达，从而为下一步的相应肿瘤动物模型的体内接种及随后的疗效观察打下基础。如果这种质粒疫苗免疫动物后能取得较好的肿瘤生长抑制效果，则是对肿瘤防治的一大贡献。

参考文献：

[1] Van den Eynde B J, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(5): 684－693.

[2] Lethe B, van den Eynde B, van Pel A, *et al*. Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a sin-

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

gle peptide[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2 283—2 288.
[3] Mäkelä P H. Vaccines, coming of age after 200 years[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 9—20.
[4] 邹丽云, 吴玉章, 贾正才, 等. 小鼠肥大细胞瘤 P815 模型的建立与初步应用[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(5): 339—341.
[5] Leitner W W, Ying H, Restifo N P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects[J]. Vaccines, 2000, 18(9-10): 765—777.
[6] Gurunathan S, Klinman D M, Seder R A. DNA vaccines: Immunology, application and optimization[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 927—974.
[7] Gurunathan S, Wu C Y, Freidag B L, *et al*. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(4): 442—447.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2000)10-0953-01

经验与短篇

1 例糖尿病并大疱表皮坏死性药疹的护理

Nursing of a diabetic patient with epidermatic necrotic epispasis bullosa

蔡红卫, 王亚华 (第三军医大学附属西南医院内分泌科, 重庆 400038)

大疱表皮坏死性药疹是药物性皮炎中最严重的一种形式。在患有糖尿病的情况下并发大疱表皮坏死性药疹, 使病情加重, 增加了护理工作的难度。根据患者的病情, 我们制定详细的护理计划, 收到了良好的效果, 现将护理体会报告如下。

1 病例介绍

患者, 女, 54 岁, 农民, 糖尿病史 4 年, 入院前 5 d 因腰痛在地摊上买草药煎服 1 剂后, 大约 2 h 后出现全身皮肤瘙痒, 逐渐出现皮肤红斑, 并全身蔓延, 以腰部、四肢为主, 院外对症治疗无好转, 转入我院。入院查体, 体温 36.3 ℃, 脉搏 84 次/min, 呼吸 19 次/min。意识清楚, 精神较差。腰背部、臀部、四肢皮肤可见大片融合成片的红斑, 其间有大量水泡散在分布, 部分破溃, 表面有较多浆液, 局部皮肤温度升高, 颜面、上胸部皮肤正常。实验室检查: 白细胞 10.9× 10^9/L, 中性 88%, 血钾 3.21 mmol/L, 血糖 13.43 mmol/L。经抗菌消炎、创面处理、精心护理, 16 d 后患者痊愈出院。

2 护理

2.1 皮肤护理

皮疹相互融合、破溃是细菌良好的培养基, 激素的应用, 又使患者免疫状况极为低下[1], 再加上患者本身患有糖尿病, 破溃部位不易愈合, 若护理不当极易导致败血症。因而加强皮肤护理, 保护皮肤不受损伤或感染是护理成败的关键。

2.1.1 避免各种不良刺激 保持床单干燥、柔软、平整、无皱褶, 随时清除剥脱的皮痂、皮屑和药痂。由于该患者腰背部、臀部及四肢较重, 对此嘱患者取俯卧位, 尽量避免或减少创面受压。勤剪指甲, 防止皮肤抓伤。

2.1.2 创面处理 严格无菌技术操作, 每日用无菌生理盐水清洗创面, 清除痂皮, 然后用紫草油、1%龙胆紫溶液及欧可欣乳膏均匀地涂于破溃处, 创面处理后采用暴露和远红外线照射方法交替, 减少渗出, 促进皮肤干燥结痂。

2.1.3 建立有效的静脉通道, 保证激素及抗菌药物的实施。护理人员应具备娴熟的穿刺技术, 在布满疱疹的肢体上选择好静脉, 为减少反复静脉穿刺造成的皮肤损伤, 我们采取留置静脉穿刺针的办法, 一次穿刺保留 2~3 d, 穿刺针眼处用小块消毒纱布覆盖, 每日更换纱布并消毒针眼周围皮肤。拔输液针头或换药前, 先用生理盐水棉球浸湿胶布后揭去, 以免去胶布时损伤皮肤。

2.1.4 认真观察刚脱皮后的创面有无水肿、渗出、糜烂, 尤其要观察皮肤的破损处有无感染先兆发生。

2.2 实行保护性隔离

糖尿病患者机体多种防御功能缺陷, 对入侵微生物的反应的各阶段都被抑制, 从而使患者极易感染[2]。为防止该患者发生各种感染, 我们安排患者住单人病房, 保持病房清洁, 每日用紫外线灯进行空气消毒。严格控制探视人员, 避免交叉感染。

2.3 严密监测血糖

在使用激素的情况下, 患者血糖较高, 以餐后及睡前升高明显, 波动在 18~25 mmol/L 之间。高血糖使血渗透压升高, 抑制白细胞的吞噬功能, 使机体对感染的抵抗力降低, 感染又易

(下转 960 页)

作者简介: 蔡红卫(1967—), 女, 浙江省海宁市人, 主管护师, 发表论文 5 篇。电话: (023)68754000—73063

收稿日期: 2000-03-07; 修回日期: 2000-07-20

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