DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.08.002

表 1 严重烧伤病人血浆血栓调节蛋白,游离蛋白 S及 D-二聚体水平的变化

Tab 1 Changes of plasma levels of thrombomodulin, free protein S and D-dimer in severely burnt patients($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Trombomodulin(ng/ml)	Free protein S(μg/ml)	D-dimer(mg/L)
Normal control	10	2.5887± 0.2706	13.5216± 1.4520	0.2233± 0.0363
Postburn 1 d	10	46.1055± 4.3438**	3.4175± 0.5263**	4.3197± 2.9405**
3 d	10	45.2674± 5.4808**	5.494± 1.0878**	3.8170± 0.2043**
5 d	10	43.5259± 7.6785**	8.5609± 1.0044**	3.0636± 2.7236*
7 d	10	18.7755± 2.3270**	11.3269± 1.4224**	2.8858± 1.2393**

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* Normal control group

3 讨论

血栓调节蛋白是一种内皮细胞膜蛋白,它也是一种血管内皮细胞损伤的标志[2,3]。既往研究显示:在蛋白 C抗凝途径中,凝血酶与其高粘附性受体即血栓调节蛋白结合后,就从一种促凝酶转变为一种抗凝酶。血栓调节蛋白作为蛋白 C活化的辅因子,极大地加快了蛋白 C活化的速度。游离蛋白 S作为辅因子大大加快了活化蛋白 C灭活凝血因子Va和Ⅷa的速度[1]。

严重烧伤后血管内皮细胞损伤、变性和脱落,基底膜和胶原暴露,激活凝血因子Ⅻ而启动内源性凝血系统。与此同时,受损伤的皮下脂肪组织释放大量的组织因子即凝血活酶(凝血因子Ⅲ)入血,激活外源性凝血系统。因此,严重烧伤后面临 DIC形成的危险[4]。但血栓调节蛋白与烧伤后 DIC形成的关系,尚未见报道。

我们的结果显示:严重烧伤后病人血浆血栓调节蛋白水平持续升高,伤后第 7天虽有下降,但仍高于正常对照组。这与 Nakae等新近报道的结果相似[5]。提示严重烧伤后病人血管内皮细胞严重受损。严重烧伤后病人血浆血栓调节蛋白水平增高的机理,一方面源于伤后血管内皮细胞直接破坏,另一方面与 TNF等炎症介质有关。严重烧伤后病人血浆中作为活化蛋白 C灭活凝血因子Va和Ⅷa的辅因子的游离蛋白 S的水平伤后第 1天即显著下降,而后虽有回升,但伤后第 7天仍低于正常对照组。显示严重烧伤后蛋白 C天然抗凝途径作用可能受到削弱。D-二聚体近年来被推崇为 DIC诊断特异性指标之一[6,7]。我们在本试验中发现,严重烧伤后病人 D-二聚体血浆水平持续升高,而后虽逐渐有所回落,至伤后第 7天仍高于正常对照组。提示严重烧伤后早期即有 DIC形成的可能。我们进一步的统计分析表明,严重烧伤病人 D-二聚体与血栓调节蛋白血浆水平呈显著正相关($r=0.9096$, $P<0.05$),与游离蛋白 S血浆水平呈显著负相关($r=-0.8972$, $P<0.05$);而游离蛋白 S与血栓调节蛋白血浆水平呈显著负相关($r=-0.9145$, $P<0.05$)。因此,严重烧伤后血浆血栓调节蛋白水平越高,游离蛋白 S水平越低,则发生 DIC的可能性越大。

针对以上结果,我们作出如下初步推断:严重烧伤后直接和间接因素导致血管内皮细胞严重受损,加上大量的血细胞破坏以及组织因子的释放,激活了凝血系统,导致血栓形成。与此同时受损的内皮细胞释放大量的血栓调节蛋白激活了蛋白 C抗凝途径,引起游离蛋白 S消耗性降低,致蛋白 C抗凝途径的作用减弱,终无力阻止 DIC的形成。因此,严重烧伤导致血管内皮细胞损伤及蛋白 C抗凝途径的作用减弱是烧伤后 DIC形成的重要原因之一。

参考文献

1 Esmon C T. The protein C anticoagulant pathway. Arterioscler Thromb, 1992, 12(2): 135

2 Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, *et al*. Plasma thrombomodulin: new approach of endothelium damage. Int Angiol, 1993, 12(4): 355

3 Hergesell, Andrassy K, Nawroth P. Elevated levels of markers of endothelial cell damage and markers of activated coagulation in patients with systemic necrotizing vasculitis. Thromb Haemost, 1996, 75(6): 892

4 刘世康,方之扬.烧伤后播散性血管内凝血.见:黎 鳌主编.烧伤治疗学.第 2版.北京:人民卫生出版社,1995. 115~116

5 Nakae H, Endo S, Inada K, *et al*. Plasma levels of endothelin-1 and thrombomodulin in burn patients. Burns, 1996, 22(8): 594

6 Amstutz P, Moyo J S. Disseminated intravascular coagulations. Cah Anesthesiol, 1996, 44(3): 219

7 Watanabe K. Clinical diagnosis of thrombosis and blood coagulation tests. Rinsho Byori, 1998, 46(3): 235

(收稿: 1998-12-29;修回: 1999-03-31)

(编辑 刘 鹏)

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

Observation on and correlative analysis of changes in plasma levels of D-dimer, thrombomodulin and free protein S in severely burnt patients*

Tan Wenfeng, Yang Zongcheng, Wang Jiahan, Peng Yizhi, Peng Daizhi, Luo Qizhi, Yu Bin, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the effects of vascular endothelial cell damage on postburn DIC development in severely burnt patients. Methods: The plasma antigen levels of thrombomodulin, free protein S and D-dimer were determine on the 1st, 3rd, 5th and 7th day following injury in 10 patients (18~ 45 years old) suffered from 40~ 50% TBSA full-thickness skin burns. Ten healthy male volunteers were selected as the controls. Results: The plasma levels of thrombomodulin and D-dimer were persistently increased on the 1st, 3rd, 5th and 7th day postburn and there was significantly positive correlation between these two. The plasma level of free protein S was decreased on the 1st day, then gradually increased and still lower than that in the controls on the 7th day postburn. It was negatively correlated to that of D-dimer. Conclusion: Endothelial cell damage and diminution of the effects of protein C anticoagulant pathway are important reasons for DIC development following burns.

Key words burns; thrombomudulin; D-dimer; protein S; endothelial cell

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700

个案与短篇

低速离心法去除细胞培养中霉菌污染

Eliminating the mycete pollution in the cell culture by low-speed centrifugation

杨 卫兵* 刁庆春 叶庆佾 (第三军医大学附属西南医院皮肤科) 重庆, 400038

细胞培养过程出现霉菌污染是一常见而又非常棘手的问题。对于污染的培养细胞,除了将它们注入动物体内除菌外[1],尚未见其他有效的清除霉菌污染的报道。我们成功地尝试了一种简易的清除霉菌污染的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养中霉菌污染的确定

取疑有污染的杂交瘤细胞置于 RPMI-1640培养液进行传代培养,于培养第 2 3天后于倒置显微镜下观察细胞形态,离心后进行 PAS染色霉菌镜检及霉菌培养(沙氏琼脂培养基,于温室和 37℃下常规培养 1周,以下霉菌培养条件同此)。

1.2 动物体内除菌法去除细胞培养中的霉菌污染

将霉菌污染的杂交瘤细胞注入 Balb/c小鼠腹腔中,待小鼠腹部膨隆后收集腹水,离心(1 000 r/min)后,弃上清液,得细胞沉淀,RPMI-1640培养液稀释,显微镜下观察细胞成份,同时行 HE染色、革兰氏染色、PAS染色后霉菌镜检及霉菌培养。

1.3 两性霉素 B对细胞培养中霉菌污染的作用

于培养液中分别加入浓度为 10μg/ml 5μg/ml 3μg/ml 1μg/ml的两性霉素 B,每日观察细胞形态。

1.4 低速离心法去除细胞培养中的霉菌污染

将以上从 Balb/c小鼠腹水中得到的存在霉菌污染的杂交瘤细胞置于无血清 PMRI-1640培养液中,进行低速离心(500~ 800 r/min),每次离心后弃上清液,用消毒棉签吸净离心管中残存液体,并用棉签轻轻吸掉细胞沉淀的表层细胞。如此反复 6~ 9次,每次离心前后均于显微镜下观察细胞。将以上反复低速离心后的细胞于 RPMI-1640培养液中进行传代培养,同时行霉菌培养,每日观察细胞形态。

2 结果

2.1 细胞培养过程中霉菌污染的确定

有污染的杂交瘤细胞进行培养,第 2天细胞贴壁差,镜下见大量漂浮细胞,细胞膜不光滑,培养液尚清亮;培养至第 3天,培养液变浑浊,镜下可见许多微小生物的布郎运动,细胞死亡;PAS染色镜检证明有菌存在,霉菌培养证实为白色念珠菌。

(下转 553页)

* 杨卫兵,男,30岁,主治医师,硕士,现在解放军 181医院皮肤科 桂林, 541002

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