

射液配制成三酰甘油浓度分别为 3.5 mmol/L 和 8.0 mmol/L 两种。胆红素干扰物直接使用宁波普瑞柏生物科技有限公司的胆红素冻干标准品(79.3 μmol/L)。取混合血清标本(浓度为 5.33 mg/L)分成 6 份,每份 500 μL,其中每份分别加入 25 μL 的含 0.9%氯化钠注射液、5.0 g/L 和 10.0 g/L 血红蛋白、3.5 mmol/L 和 8.0 mmol/L 三酰甘油、79.3 μmol/L 胆红素干扰物,用 PETIA 对每例样本进行双次测定,观察以上各因素是否产生干扰。

3 讨论

CysC 是一种低分子蛋白质,相对分子质量小,其浓度不受肾外因素的干扰,产生速率恒定,只能通过肾小球滤过排泄,并在近曲小管几乎完全被重吸收,不再重新回到血液循环中,同时,肾小管也不分泌 CysC^[1]。因此,CysC 是判断 GFR 的良好指标,是 2002 年美国食品药品监督管理局网上公布的 26 项在检验医学中有重大突破的全新检测项目之一。

在目前的检测方法中,如单纯就检测灵敏度而言,RID 最差,而 ELISA、RIA 及 FIA 均优于 PENIA 和 PETIA^[2-4]。由于 RIA 存在放射性污染,FIA 需昂贵的仪器,RIA、FIA、ELISA 测定时间长,且不能自动化分析。虽然 PENIA 和 PETIA 检测灵敏度差些,但检测敏感度远远低于健康人 CysC 浓度的下限值,因此目前实验室中主要采用这两种方法,特别是 PETIA 由于仅需普通生化分析仪即可测定,因此 PETIA 已作为常规临床中首选方法。

本文依据 NCCLS EP9-A2 文件要求对 PETIA 进行了方法学评价,结果表明,实验结果达到该系统所要求的精密度小于 5%的要求,如单从 CV 值来看,批内小于批间,中值稳定性相对好于高值和低值。以 Dade Behring BN Prospec 特定蛋白分析仪的 PENIA 为比较系统,PETIA 为实验系统,所得回归方程为: $Y=1.007X-0.0164, r=0.9937, P<0.01$ 。a 接近

于 0, b 接近于 1, $r>0.95$,符合临床实验要求,有很好的可比性。同时实验也表明,5.0 g/L 和 10.0 g/L 血红蛋白、3.5 mmol/L 和 8.0 mmol/L 三酰甘油、79.3 μmol/L 胆红素干扰物对该法测定干扰均小于 3%。回收试验中平均回收率为 94.7%,也基本符合临床检验要求。在线性试验中,相关方程为 $Y=1.0248X-0.0943$,提示该法在 0.64~8.05 mg/L 范围内线性良好。

综上所述,PETIA 仅需要在普通实验室生化分析仪上进行测定,操作简单,无需其他特殊的设备,成本低,十几分钟即可完成测定,具有较好的重复性,有较宽的线性范围,抗干扰性强,与 PENIA 也有很好的相关性。完全符合实验室常规检测的需要。

参考文献

- [1] 张淑兰,王铭超,李青果,等.胱抑素 C 的临床应用与进展[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,2002,23(5):2271-2272.
- [2] Kabanda A, Jadoul M, Pochet JM, et al. Determinants of the serum concentrations of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis[J]. Kidney Int, 1994, 45(6):1689-1696.
- [3] Cattaneo A, Sansor JL, Prevot D, et al. Turbidity, Cystatin Proteinases and their inhibitors [M]. Berlin: Walter de Gruyter, 1986:507-516.
- [4] Akhtar MH, Emara M, Moselhi HE, et al. Comparing measures of cystatin C in human sera by three methods [J]. Am J Nephrol, 2008, 29(5):381-391.

(收稿日期:2011-06-19)

• 临床研究 •

烧伤患者血清透明质酸浓度的检测

周 兵(江苏省泰州市第四人民医院 225300)

【摘要】 目的 探讨大面积烧伤患者血清透明质酸(HA)浓度变化与肝细胞损伤的关系。**方法** 采用放射免疫和酶联免疫吸附试验等技术,比较分析烧伤严重程度不同及其并发全身炎症反应综合征(SIRS)、多脏器功能障碍综合征(MODS)、多器官功能衰竭(MOF)和死亡患者各组血清 HA、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和临床常规肝肾功能指标。**结果** 烧伤后 2 周内血清 HA 浓度一直维持高水平,并随烧伤严重程度增加和 SIRS、MODS 的产生其数值逐步升高,差异有统计学意义($P<0.01$),但在 MODS 向 MOF 发展直至死亡前后,血清 HA 值又由高限急剧降低。直线相关分析显示,血清 HA 浓度变化与烧伤严重程度和 SIRS 等并发症的发生和发展密切相关,差异有统计学意义($P<0.01$),与血清 TNF-α 和天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而与血浆清蛋白、清蛋白/球蛋白比值呈负相关,差异也有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清 HA 浓度中、重度升高可能与 TNF-α 等持续损伤肝内皮细胞功能有关,可将其作为临床大面积烧伤患者肝损伤、病情严重程度和预后判断的敏感指标。

【关键词】 烧伤; 透明质酸; 肿瘤坏死因子; 肝损伤

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.22.046 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)22-2777-03

有研究显示,血清透明质酸(HA)可作为肝病患者肝损伤程度和肝纤维化的早期无创性诊断指标^[1]。肝损伤是大量

烧伤患者常见的并发症,血浆清蛋白、球蛋白及血清酶学等肝功能指标常受大面积皮肤组织损伤、血浆渗出(丢失)和感染等

因素的影响,难以客观反映肝功能情况。本文采用放射免疫分析法(RIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测不同程度烧伤患者血清中 HA 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度,结合临床常用的肝功能检测指标进行统计学处理,以寻求敏感、特异和廉价的肝细胞损伤指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择 1996 年 11 月至 2010 年 1 月本院住院治疗的 52 例烧伤患者,依照 1970 年上海全国烧伤会议的分类标准进行分组:(1)特重度烧伤(A)组 18 例,其中男 14 例,女 4 例;烧伤面积(67.5 \pm 10.8)%,Ⅲ度烧伤(41.2 \pm 13.6)%;年龄(31.7 \pm 10.6)岁;死亡 8 例者并发中、重度吸入性损伤。(2)重度烧伤(B)组 16 例,其中男 10 例,女 6 例;烧伤面积(40.6 \pm 7.1)%,Ⅲ度烧伤(14.5 \pm 4.2)%;年龄(28.3 \pm 12.7)岁。(3)中度烧伤(C)组 10 例,其中男女各 5 例;烧伤面积(23.8 \pm 6.7)%,Ⅲ度烧伤(6.8 \pm 2.1)%;年龄(20.4 \pm 6.3)岁。(4)轻度烧伤(D)组 10 例,其中男女各 5 例;烧伤面积(7.2 \pm 2.2)%,Ⅲ度烧伤散在或无;年龄(26.7 \pm 13.0)岁。选择同期住院的整形患者 10 例作为健康对照(NC)组,男女各 5 例,年龄(25.8 \pm 9.5)岁。所有患者入院时检测肝功能均正常,肝炎病毒检测阴性,既往无肝炎病史;入院后按国内常用的方法进行液体复苏、创面处理和抗感染治疗;深度烧伤患者伤后 7~10 d 进行首次切(削)痂植皮术,10~14 d 后进行第 2 次手术,余类推。

1.2 烧伤并发症诊断标准 全身性炎症反应综合征(SIRS)的诊断以美国胸科医师学会(ACCP)/危重病学会(SCCM)标准为基础,制订标准如下:(1)体温大于 39 $^{\circ}$ C 或者小于 36 $^{\circ}$ C,连续 3 d 以上;(2)心率大于 120 次/分;(3)呼吸频率大于 28 次/分或 PaCO₂<32 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa);(4)外周血白细胞大于 12 \times 10⁹/L 或小于 4 \times 10⁹/L;(5)精神抑郁、烦躁不安或谵语、定向力障碍;(6)舌质绛红,有毛刺。符合图 1 烧伤后不同时间血清 HA 浓度变化 4 项中 2 项以上,再加上后 2 项中任何 1 项即可诊断为 SIRS。多脏器功能障碍综合征(MODS)和多器官功能衰竭(MOF)诊断按文献[2-4]标准。

1.3 指标及检测方法

1.3.1 血清标本的收集 于患者烧伤后 1、4、7、14、28 d 和痊愈后 7 d 分别抽取空腹静脉血 5 mL,4 $^{\circ}$ C 静置 8 h 后,2 000 r/min 离心 5 min,留血清,密封后-40 $^{\circ}$ C 冻存备用。对大面积烧伤(A 组和 B 组)疑有上述并发症并致死亡者,每隔 2~3 d 留取血样本,待确诊后筛选上述样本统一送检。

1.3.2 血清 HA 浓度测定 RIA 检测试剂购自上海海医研究所,参照说明书要求操作,放射免疫计数仪(国营 262 厂生产)进行检测,计算机自动拟合半对数坐标曲线和打印检测结果。如果样本 HA>800 μ g/L 则进行倍比稀释后重新检测。

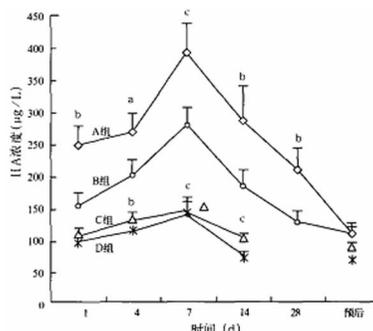
1.3.3 血清 TNF- α 浓度测定 ELISA 检测试剂盒购自北京邦定生物制品有限公司,酶联免疫仪检测每孔样本的吸光度值,绘制标准曲线,查找血清 TNF- α 值。

1.3.4 肝功能检测 同期抽取血样本检测总胆红素(T-BIL)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(GGT)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)和清蛋白/球蛋白等指标。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 统计软件进行统计学处理。

2 结果

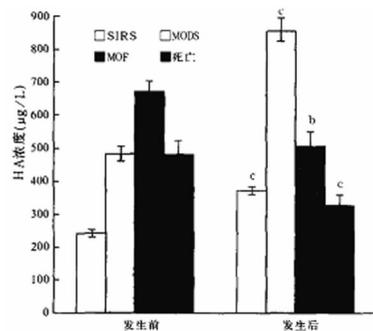
2.1 不同烧伤面积患者伤后不同时间点血清 HA 浓度的变化 见图 1。烧伤患者血清 HA 浓度随着烧伤面积增加而呈逐渐增加的趋势,大面积烧伤患者(A 组和 B 组)在烧伤后 4~14 d 血清 HA 维持在高水平,而 C、D 两组各时间点血清 HA 值未见明显差异。



注:与 B 组比较,^aP<0.05,^{b,c}P<0.01。

图 1 烧伤后不同时间血清 HA 浓度变化

2.2 并发症对血清 HA 浓度的影响 大面积烧伤患者并发症发生率或死亡前后血清 HA 浓度变化以 A 组居多。SIRS 和 MODS 患者血清 HA 浓度较发生前明显升高,以 MODS 升高幅度最大,最高 1 458.6 g/L。死亡患者在死亡前 3~7 d 血清 HA 值急剧下降,死亡即刻值降至低点(图 2)。



注:与本组发生前比较,^{b,c}P<0.01。

图 2 烧伤后不同时间血清 HA 浓度变化

2.3 烧伤患者血清 HA 水平与临床肝功能指标的相关性分析 经单因素直线相关分析,患者血清 HA 浓度与血清 TNF- α 、AST、T-BIL 呈正相关,差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01);与血浆清蛋白和清蛋白与球蛋白比值呈负相关,差异有统计学意义(P<0.05);而与 ALT、ALP、GGT、Cr 和 BUN 无相关关系。

3 讨论

1985 年 Engstrom-Laurent 等首先发现肝病者尤其在发展为肝硬化时,血清 HA 含量明显升高,因此被认为是诊断肝纤维化的良好指标之一。此外,在炎症和肿瘤患者中也明显升高,但对大面积烧伤患者肝损伤的诊断价值未见文献报道。

正常炎症反应可以防止组织损伤扩大、促进组织修复,是机体创伤修复过程中完整的生理性防御反应的一部分。超常的病理性炎症反应除可诱发初期的炎症反应外,还由于机体产生的多种炎症介质所形成的瀑布效应,使炎症反应扩大和失去

控制,最终导致以细胞自身破坏为特征的全身性炎性反应。SIRS是大面积烧伤最常见的并发症,可触发早期 MODS 的病理生理过程^[3-6]。其发生机制主要是受创伤、内毒素(LPS)、外毒素、细菌和烧伤毒素等触发剂作用,机体过度释放多种细胞因子和炎症介质,如 LPS、TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)和 IL-8 等,由此产生连锁放大反应,其中 TNF- α 在激活细胞因子方面可能起核心作用^[7]。研究表明,注射 LPS 诱生 TNF 或直接注射 TNF 可导致实验动物急性肝坏死和细胞结构、功能的广泛损害^[8]。

本研究结果显示,烧伤 2 周内患者血清 HA 和 TNF- α 浓度一直维持高水平,并随烧伤面积的增加、病情(感染)加重和并发症的产生,其血清 HA 浓度逐渐增高。轻、中度烧伤两组 HA 浓度相对较低。由此说明随着烧伤严重程度的增加,受休克、感染、多种细胞因子和炎症介质等因素的作用,一方面刺激间质细胞(主要为成纤维细胞)大量合成 HA,另一方面破坏内皮细胞,使 HA 的分解功能下降及可能是血清 HA 逐步升高的主要原因。大面积烧伤患者休克期 HA 升高,可能还与肝血流量下降及再灌注损伤有关,而休克期后则可能与持续高水平 TNF- α 等对肝脏的继发性损害密切相关。重症大面积烧伤患者由 SIRS-MODS-死亡,血清 TNF- α 和 HA 均呈现增高-极高(峰值)-下降的变化趋势,提示单核-巨噬细胞等释放大量的 TNF- α (达到峰值)导致肝、肾、脑等重要脏器细胞严重损害,肝脏摄取和降解 HA 的能力下降,使血清 HA 半衰期延长和数值急剧升高。当 SIRS 发展到 MODS 时,机体组织细胞(包括产生 TNF- α 的单核-巨噬细胞、产生 HA 的成纤维细胞或肝间质细胞和降解 HA 的肝内皮细胞等)也同样受到损伤,故患者血清 TNF- α 和 HA 浓度呈同步下降的趋势,警示预后不良。

血清 HA 与其他指标相关分析结果显示,HA 与 AST 呈正相关,与血浆清蛋白、清蛋白与球蛋白比值呈负相关,提示血清 HA 浓度变化与肝损伤程度密切相关。鉴于烧伤患者受休克期血浆渗出、创面持续蛋白丢失、感染和营养代谢失衡等诸多因素影响,因此,血浆清蛋白和清蛋白与球蛋白及其他酶学指标等常有相当的误差而影响临床对肝损害(伤)程度的判断。此外,本文还观察到血清 HA 浓度变化与 TNF- α 有非常明显的相关性。有研究表明,肝病患者血清 TNF- α 浓度变化与肝损伤程度有关,而烧伤脓毒症或 SIRS 患者血清 TNF- α 水平与疾病严重程度和病死率呈正相关。理论上,血清 HA 均可反映肝损伤的严重程度,由于血清 TNF- α 变化幅度小,仅间接反映肝损害程度(特异性较差),故临床难以推广应用。

血清 HA 浓度升高,其机制有 3 个:(1)肝功能损害使清除 HA 能力降低(主要因素);(2)间质细胞(成纤维细胞为主)合成 HA 活跃;(3)肾损伤使 HA 排出减少(次要因素)。鉴别前者与后者可用 HA 清除试验,前者 HA 在血液半衰期延长,后者正常。无病毒性肝炎的大面积烧伤患者临床上呈一

过性肝损害,治愈后未见肝纤维化的病例。故血清 HA 含量增高的主要原因可能为 TNF- α 刺激间质细胞合成 HA 增加,以及 TNF- α 损伤肝内皮细胞对 HA 的降解所致,使后者呈一过性肝损伤。HA 的 RIA 试剂具有价廉、指标稳定、灵敏和重复性好等优点。经近 3 年 100 余例烧伤患者临床验证,当血清 HA<100 μ g/L,说明无 SIRS 或肝功能正常;HA 为 100~300 μ g/L 为轻度升高,处于创伤、休克、非侵袭性感染或 SIRS 早期,HA 合成增加或肝功能受抑状态;300 μ g/L<HA \leq 600 μ g/L 为中度升高,提示由 SIRS-MODS,肝功能轻、中度受损;HA>600 μ g/L 为重度升高,提示处于 MODS 或 MOF 早期,可由肝功能不全发展为肝衰竭,预后不良。当 HA 浓度由高转低时有两种可能,缓慢下降说明临床治疗有效,肝功能好转,HA 急剧下降说明病情进一步恶化,MODS 发展为 MOF,生命垂危。对用不同来源试剂、不同时间获得的检测结果,应结合临床症状进行综合分析。

综上所述,血清 HA 与大面积烧伤患者的病情严重程度、肝损伤和病死率之间存在密切关系,有可能成为判断大面积烧伤肝功能损伤和预后的有用指标。

参考文献

- [1] 高锋,孔宪涛,王笑利,等. 细胞外间质成分与肝病关系的研究[J]. 中华内科杂志,1994,33(2):109-111.
- [2] 黎鳌,杨宗城. 烧伤外科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2001:14.
- [3] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. Chest,1992,101(6):1644-1645.
- [4] 任成山. 对多器官功能衰竭概念和诊断标准的新认识[J]. 中国危重病急救医学,1995,7(6):344-345.
- [5] Engstrom-Laurent A,Loof L,Nyberg A, et al. Increased serum levels of hyaluronateinliver disease[J]. Hepatology,1985,5(4):638-644.
- [6] Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential futuretherapy[J]. Ann Surg,1992,216(2):117-121.
- [7] Hishinuma I,Nagakawa J,Hirota K, et al. Involvement of tumor necrosis factor-Ct in development of hepat injury in galactosamine sensitized mice[J]. Hepatology,1990,12(5):1187-1192.
- [8] Old LJ. Tumor necrosis factor[J]. Science,1985,230(4726):630-634.

(收稿日期:2011-06-23)