DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2019.01.017

·论著:临床医学·

大面积重度烧伤患者 CyclinB1、CyclinC 及 PCNA 表达特征分析

谢 群,胡 强*,张瑞瑞,王 琼,山 超,杨 靖
(襄阳市中心医院,湖北文理学院附属医院整形美容科,湖北 襄阳 441021)

摘 要: 选取本院收治的大面积重度烧伤患者,根据患者预后情况分为生存组和死亡组。两组患者在1、2、3和5天时,CyclinB1和CyclinC的检测结果均有差异;PCNA在两组中的检测结果在2天、3天、5天和7天时的差异有统计学意义($P<0.05$);三个指标的检测峰值在生存组均明显高于死亡组。以上结果表明大面积重度烧伤患者中CyclinB1、CyclinC和PCNA表达特征可有效预测患者的预后情况,可作为预后的重要预测指标。

关键词: 细胞周期蛋白; 增殖细胞核抗原; 烧伤; 预后
中图分类号:R446.19 **文献标识码:**B

Expression of CyclinB1, CyclinC and PCNA and prognosis in patients with severe burns

XIE Qun, HU Qiang, ZHANG Ruirui, WANG Qiong, SHAN Chao, YANG Jing
(*Department of Plastic and Cosmetic, Xiangyang Central Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang* 441021, *Hubei, China*)

Abstract: The patients with large and severe burns admitted to a hospital were selected and divided into survival group and death group according to the prognosis of patients. The levels of CyclinB1 and CyclinC in 1, 2, 3, and 5 day in the two groups were statistically significant difference. The level of PCNA in the two groups in 2, 3, 5 and 7 day was statistically significant difference ($P<0.05$). The peak values of the three indexes were significantly higher in survival group than in death group. The above results showed that the expression characteristics of CyclinB1, CyclinC and PCNA in patients with large and severe burns can effectively predict the prognosis of patients, and can be used as an important prognostic indicator.

Key words: cell cycle protein; proliferating nuclear antigen; burns; prognosis

烧伤是指由热液、蒸气等所引起的组织损害[1],严重者也可伤及皮下或/和黏膜下组织,根据烧伤面积及严重程度可将其分为不同程度的烧伤[2]。烧伤导致人体的第一道防疫屏障遭到破坏,同时肠道的机械、生物、免疫三大屏障功能亦遭到损害,机体内环境紊乱,各组织脏器灌注不足,炎症介质释放等,都为各种微生物的入侵提供了可能,这不仅导致皮肤组织的损伤,处理不当时病情更趋危重,易引发一系列并发症[3]。有研究发现[4-6],细胞周期蛋白B1(CyclinB1)、细胞周期蛋白C(CyclinC)、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达与细胞增殖有关,能加快细胞增殖,促进创面的愈合情况,本研究分析大面积重度烧伤患者创面组织中细胞周期蛋白CyclinB1、CyclinC以及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究中所有研究对象均来自我院收治大面积重度烧伤患者,收治时间均在2017年1月—2018年1月,根据纳入标准,共收集患者83例,根据患者预后情况分为生存组和死亡组。其中生存组45人,死亡组38人,生存组中男孩25例(60.87%),女孩18例,平均年龄为(10.6±2.1)岁;死亡组中男孩16例(71.01%),女孩13例,平均年龄为(9.3±2.7)岁。通过假设检验的,生存组患儿与死亡组患儿之间的所有基本资料的差异均无统计学意义(P

收稿日期:2018-12-10;**修回日期:**2018-09-10
* **通信作者,**E-mail: 306620787@qq.com.

>0.05),结果见表1。收集所有患者的基本资料,主要有年龄、性别、烧伤总面积等信息,对其基本情况进行比较,并采集患者在治疗期间的不同时间的创面标本备用。患者纳入标准:①患者经过诊断,确定为大面积重度烧伤患者;②患者年龄为16~60岁;③烧伤总体表面积(total body surface area,TBSA)≥50%;④获得患者同意。患者排除标准:①烧伤时患者伴有胸腹部重要脏器损伤及严重颅脑外伤;②患者既往合并有重要脏器严重疾病;③临床资料记录严重不全者;④诊疗不配合者。根据纳入标准和排除标准,将纳入研究的83例患者根据患者病情发展情况分为不同组别,并收集所有患者的基本信息及相关指标。

表1 生存组与死亡组患儿间基线资料的比较

变量	分类	生存组(45)	死亡组(38)	x^2/t 值	P 值
性别	男	27	23	0.062	0.803
	女	18	15		
年龄(岁)		33.8±20.2	37.6±21.7	2.625	0.472
伤后至入院时间(h)		3.76±2.55	4.18±3.04	1.635	0.243
烧伤面积(%)		77.3±7.4	82.6±5.6	1.374	0.177

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 将83例大面积重度烧伤患者根据病情发展情况和结局分为生存组和死亡组。收集所有患者烧伤面积及伤后第1、2、3、5、7、9、13天,距离创面边缘0.5cm处的创面标本,为避免影响愈合,每次取创面标本尽量避免破坏焦痂、结痂处,且对糜烂、化脓处及时予以消炎抗菌处理,每次取创面积约为0.3×0.3 cm。采用4%多聚甲醛将创面组织固定,石蜡包埋,备用。

1.2.2 标本制备 所有采集标本经石蜡包埋,4μm切片。切片常规脱蜡、脱水,通过苏木精—伊红染色法(HE)对样本行病理组织切片观察。通过免疫组织化学法染色,石蜡切片常规脱蜡,采用3%的过氧化氢溶液常温孵育20 min。水洗3次。用于PCNA检测的染色切片置于pH为6.0的0.01mol/L的枸橼酸盐缓冲液中进行5min抗原微波修复,用PH为7.2的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,之后加入1∶200的PCNA一抗,常温孵育2h;用于CyclinB1和CyclinC检测的染色切片经EDTA高压抗原修复2min,用PBS洗涤3次,之后分别加入1:50稀释的CyclinB1一抗和1:200的CyclinC一抗,常温孵育4h,滴加由生物素标记的二抗,常温孵育40min,PBS洗涤3次,通过DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片等备用。

1.3 观察指标

采用400倍光学显微镜下观察制片结果,每个切片随机选择5个视野,运用德国全自动图像分析系统(KONTRON IBAS2.5)进行免疫组化染色的定量分析,从而计算平均阳性单位值(PU)[7]。最后,观察比较两组患者的切片结果,判断两组之间的差异是否具有统计学意义。

1.4 统计学分析

通过Excel软件对所有患者的资料,进行录入和处理,运用SPSS17.0,选择恰当的统计指标对患者基本资料进行统计描述;采用χ^2检验对两组患者的基线资料进行比较,判断其是否均衡可比;通过t检验、方差分析或χ^2检验等方法比较两组患者创伤标本的检测结果,判断差异是否具有统计学意义。无特殊情况下$P<0.05$,表示具有统计学差异。

2 结 果

2.1 两组创面肉芽组织特征

两组第13天肉芽组织的HE染色病理切片结果见图1。死亡组肉芽组织较多,具有更多的炎性细胞、有较多的炎性细胞浸润(如白色箭头所指)核固碎等。

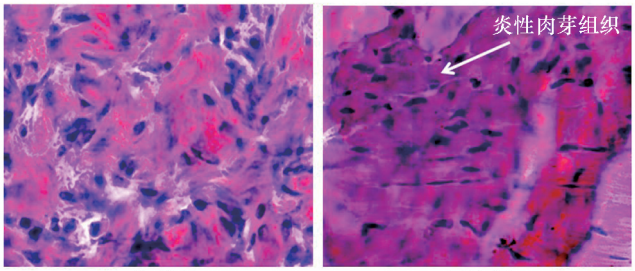

图1 生存组与死亡组患者病理组织特征结果

2.2 两组患者CyclinB1的检测结果

首先检验两组患者在不同治疗时间的CyclinB1的检测结果分布情况,发现检测结果近似服从正态分布,采用两独立样本t检验对检测结果进行比较。结果显示,患者创伤治疗后的第1、2、3、5、7天时,两组患者CyclinB1的检测结果间的差异具有统计学意义(均有$P<0.05$),并且在生存组中,治疗后第3天的CyclinB1水平达到峰值(图2.1),而死亡组在第5天才达到峰值。结果见表2。

表 2　两组患者 CyclinB1 比较

组别	*n*	时间(天)						
		1	2	3	5	7	9	13
生存组	45	20.75±3.23	25.52±4.22	27.66±3.19	20.49±4.48	14.55±5.03	6.81±3.43	1.38±0.87
死亡组	38	18.69±4.17	19.31±5.64	20.19±5.86	25.61±5.94	18.18±7.01	7.66±5.14	1.12±0.97
t		2.534	5.729	7.362	−4.471	−2.739	−0.898	1.287
P		0.0132	0.0001	0.000011	0.0001	0.0076	0.372	0.202

2.3　两组患者 CyclinC 的检测结果

研究结果显示,在治疗后的第 1、2、3、5、7 天时,两组患者创面标本中 CyclinC 的检测结果间的差异具有统计学意义(均有 $P<0.05$),9 天和 13 天时,差异无统计学意义(均有 $P>0.05$),另外在生存组中,治疗后第 2 天的 CyclinC 含量达到峰值(图 2.2)。具体情况详见下表 3。

2.4　两组患者 PCNA 的检测结果

通过统计学分析比较两组患者在住院后不同时间的 PCNA 的检测结果。结果显示,在治疗后的第 2、3、5、7 天时,两组患者创面标本中 PCNA 的检测结果间的差异具有统计学意义(均有 $P<0.05$),且在 1、9 和 13 天时,两组患者标本中 PCNA 的检测结果差异无统计学意义(均有 $P>0.05$);在生存组中,治疗后第 2 天的 PCNA 含量达到峰值(图 2.3),而死亡组在第 3 天达到峰值,且最高含量仍低于生存组。具体情况详见下表 4。

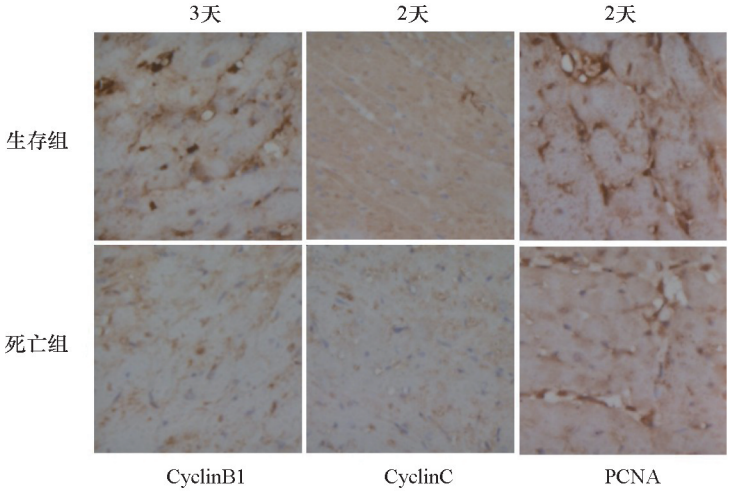

图 2　生存组与死亡组患者 CyclinB1, CyclinC 和 PCNA 结果

表 3　两组患者的 CyclinC 比较

组别	*n*	时间(天)						
		1	2	3	5	7	9	13
生存组	45	23.58±2.34	26.42±2.02	20.36±1.19	15.88±2.42	11.55±0.65	4.63±1.78	1.58±0.21
死亡组	38	19.83±3.05	21.11±3.64	24.19±4.83	18.61±2.25	13.18±1.92	4.79±1.13	1.43±0.93
t	−	6.333	8.382	−5.143	−5.287	−5.349	−0.478	1.052
P		0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.00003	0.633	0.296

表 4　两组患者的 PCNA 比较

组别	*n*	时间(天)						
		1	2	3	5	7	9	13
生存组	45	22.88±2.93	27.74±2.13	23.63±1.51	12.68±1.19	6.63±1.35	6.34±0.62	1.95. ±0.77
死亡组	38	21.63±3.05	21.19±2.49	25.83±2.10	16.71±2.76	10.82±1.03	6.48±0.56	1.74±0.65
t	−	1.900	12.918	−5.537	−8.874	−15.662	−1.071	1.328
P		0.609	0.0001	0.00002	0.0001	0.0001	0.287	0.188

3 讨 论

烧伤是中国较为常见的一种意外伤害,虽然近些年来医疗技术得到了快速的发展,大大提高了烧伤患者的生存率,而大面积烧伤,通常使得人体防御体系的第一道防御屏障受到破坏,并且影响肠道的机械、生物以及免疫功能,常导致机体内环境紊乱,各重要组织脏器血灌流量不足,释放各种炎症因子,神经内分泌功能及免疫功能紊乱,并且感染机率明显提高,通常情况下患者病情会日趋严重,因此,目前大面积重度烧伤成为烧伤治疗和研究的重点[2]。

皮肤烧伤创面的愈合是一种较为复杂的生物学过程,主要包括炎性反应、细胞增生等基本过程[8],而创面的愈合又受多种外界及内在的影响和调控。细胞周期是细胞增殖和细胞生命活动的基本过程,而细胞周期蛋白的合成与分解在真核生物细胞周期的调控中起着至关重要的作用。cyclin 在细胞周期内是不断变化的,cyclin 与细胞周期蛋白依赖激酶结合后成为具有活性的二聚体,进而调控细胞周期的进程[9],研究发现,细胞周期蛋白 B1 与细胞周期蛋白 G1 是细胞分裂,生长过程中重要的调节因子,是细胞周期蛋白中较早发现并且在 G2-M 期产生重要作用的蛋白分子[15-16]。CyclinB1 在细胞周期中的 S 晚期的细胞浆中,当 CyclinB1 转送至细胞核时,细胞进入 G2 期,因此认为 CyclinB1 在细胞周期中的 G2 或 M 期起到重要的调控作用[10-12],另外,CyclinC 只表达于细胞周期的 G1 期中点,并在 G1 期发挥重要作用[10];PCNA 是分子量为 36KD 的酸性蛋白,主要表达于细胞周期中的 S 期,参与 DNA 的合成,存在于细胞核内且在细胞核内合成,细胞周期中反映 DNA 的复制、合成状态,因此仅在增殖细胞的细胞核中表达,是判断肿瘤细胞增殖状态的标志物及良好指标[13-14,18-19]。在组织形成期(创伤后 2 ~10 天),创面愈合中关键的效应细胞—成纤维细胞迅速增殖,合成大量胞外基质,填补组织缺损,创面细胞周期蛋白 B1(cyclin B1)和增殖细胞核抗原(PCNA)表达,可以增加 S+G2 期细胞数目,从而加快创面细胞增殖,促进创面愈合[17]。

本文研究结果显示,大面积重度烧伤患者在烧伤后治疗期间,创面标本中的 CyclinB1、CyclinC 和 PCNA 含量是不断变化的。并且在 1、2、3 天和 5 天时,两组患者 CyclinB1 和 CyclinC 的检测结果差异均具有统计学意义(均有 $P<0.05$),且生存组分别在第 3 天和第 2 天含量达到峰值,与死亡组相比明显提前,而 PCNA 在两组中的检测结果在 2、3、5 和 7 天时的差异有统计学意义(均有 $P<0.05$),生存组在第 2 天时含量达到峰值;另外,三个检测指标的检测峰值在生存组均明显高于死亡组,这很可能与细胞增殖速度,创面愈合情况相关[5]。根据本文结果表示 CyclinB1、CyclinC 和 PCNA 含量对患者的预后情况具有一定的评估价值,可作为大面积重度烧伤患者预后情况的指标。

参考文献:

[1] 李峥.严重烧伤并发多器官功能障碍综合征患者高迁移率族蛋白 B1 的水平变化及临床意义分析[J].现代中西医结合杂志,2018,27(25):2780-2.

[2] 李康,安文珍,杜少博,等.小鼠角膜碱烧伤后缺氧诱导因子-1α 和水通道蛋白-1 在角膜中的表达[J].眼科新进展,2018,38(4):306-9.

[3] 张斌杰,周丽娜.重组人源胶原蛋白凝胶联合创面磨痂术在深Ⅱ度烧伤患者中的应用[J].广西医科大学学报,2018,35(3):323-7.

[4] 段晨旺,周建宏,魏刚强.外周血可溶性髓系细胞触发受体-1 与可溶性血红蛋白清道夫受体对烧伤患者脓毒症的诊断价值研究[J].中华医院感染学杂志,2018,28(5):730-733.

[5] 陈宝国,田晓东,黎凤明,等.用胶原蛋白海绵治疗深Ⅱ度烧伤创面的效果评价[J].当代医药论丛,2018,16(2):86-7.

[6] 李兴龙.硫化氢对烧伤大鼠体外培养皮肤巨噬细胞 MAPK 信号传导通路 ERK、JNK 及 p38 蛋白作用的影响[D].西宁:青海大学,2017:12-3.

[7] 任忠亮,薛佳杰,郭雷,等.外周血中性粒细胞 CD_(64)与 C 反应蛋白诊断烧伤感染的临床价值[J].临床误诊误治,2017,30(5):78-81.

[8] 靳天.ERK 蛋白在烧伤大鼠骨骼肌对罗库溴铵抵抗时乙酰胆碱受体改变中的作用[D].蚌埠医学院,2017:11.

[9] 高小春.高迁移率族蛋白 B1 在烧伤创面早期进展中作用的实验研究[D].泸州:西南医科大学,2017:7.

[10] 杨智斌,吴学军,马强,等.FGF 生物蛋白海绵治疗烧伤残余肉芽创面的疗效[J].宁夏医科大学学报,2017,39(2):183-185.

[11] 盖丽,盖静,李加恒.生肌玉红膏对深Ⅱ度烧伤大鼠血清中炎症介质含量的影响[J].中兽医医药杂志,2016,35(5):59-61.

[12] 谷军生.miR-144 靶向细胞周期蛋白 B1 抑制肝癌增殖、迁移和侵袭的初步研究[D].郑州:郑州大学,2016:8.

[13] 徐海涛,王敏,向喜娟.深Ⅱ度烫伤创面局部应用神经生长因子-胰岛素凝胶后微血管密度及增殖细胞核抗原的变化[J].中国组织工程研究,2018,22(22):3506-12.

[14] 李先慧,王晓娟,刘德贵,等.烧伤患者血浆凝溶胶蛋白水平及其与预后的关系研究[J].华西医学,2016,31(12):2027-9.

[15] 武志峰.CyclinB1 与 CyclinG1 在非小细胞肺癌中的表达及其研究[D].石家庄:河北医科大学,2010.

[16] 李文鹏,赵高炀,杨薛康,等.钠氢交换蛋白 1 抑制剂对严重烧伤后多脏器损伤大鼠的保护作用研究[J].海军医学杂志,2017,38(1):14-7.

[17] 鲁铭,朱晶.不同浓度重组 Canstatin 蛋白对碱烧伤后角膜 MMP-2 及 TIMP-2 表达的影响[J].国际眼科杂志,2016,16(2):224-7.

[18] 李锐,李晓丽.甲状腺癌患者癌组织中 CD34、增殖细胞核抗原和内皮细胞特异分子-1 的表达及意义[J].中国老年学杂志,2018,38(16):3881-3.

[19] 李先慧,王晓娟,刘德贵,等.烧伤患者血浆凝溶胶蛋白水平及其与预后的关系研究[J].华西医学,2016,31(12):2027-9.

(本文编辑:秦旭平)