

衰竭模型已经得到公认^[2]。实验结果显示, ADR 作用后, 大鼠的毛发、体重均与正常对照组有明显的差异; 3 周后心功能检测、心脏病理学观察发现心肌有变性以及坏死病理改变, 与正常对照差异明显, 为进一步研究药物作用机制提供基础。

凋亡是缺血和非缺血性心脏病心肌细胞死亡的形式之一, 在 CHF 的发生发展中起到重要作用^[3]。Bax 与 Bcl-2 是一对常用的促凋亡和抗凋亡基因, Bax/Bcl-2 代表凋亡程度, 当值在大于 1 时, 促进心肌细胞凋亡。当值在小于 1 时, 抑制心肌细胞凋亡。模型组病理形态学显示, 心肌细胞呈一定量的凋亡, 心脏室壁张力以及心脏指数的改变, 凋亡相关基因 Bcl-2 明显降低, 提示 ADR 能过特定信号通路激活凋亡家族基因诱导凋亡。造模后经利心冲剂治疗后, 以上病理及病理生理学的改变均得到一定的改善, 利心冲剂减少心肌细胞凋亡, 缓解心肌重构, 改善心功能, 降低 Bax/Bcl-2 比值, 从而使得线粒体的通透性降低, Caspase9 释放减少, 抑制线粒体依赖性凋亡信号通路从而对心力衰竭心肌细胞起保护作用。

近年来, 慢性心力衰竭的氧化应激机制和抗氧化剂在慢性心力衰竭病变过程中的防治作用日益引起关注^[4,5]。值得注意的是, 细胞凋亡和氧化压力往往交织在一起, 不可分割。当心肌细胞缺血时, 激活心肌细胞中 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX)、黄嘌呤氧化酶等产生 ROS, 此外, 凋亡可以引起免疫

细胞的激活从而产生 ROS。实验结果显示, ADR 增高的 ROS 可促进 Ca^{2+} 内流, 上调 Bax 的表达, 线粒体通透性转变孔的开放, Caspase 家族的激活, 导致细胞凋亡; 利心冲剂能增加心肌细胞以及血清中 SOD_1 的活性, PGC-1 α 的表达, 激活 UCP2 和 UCP3 的表达, 从而消除阳离子梯度、降低线粒体膜电位、减少线粒体 ROS 的生成, 加速 ROS 的清除, 减少心肌细胞的损伤, 改善心脏功能。对于其作用的分子信号通路仍有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 高想, 倪卫兵, 陶志强, 等. 中西医结合治疗慢性心力衰竭 60 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2007, 39(6): 32-33
- 2 阳冠明, 孙胜涛, 李树全. β 胡萝卜素对 ADR 致大鼠心肌组织的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达改变的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 465-470
- 3 Schulze PC, Spate U. Insulin-like growth factor and muscle wasting in chronic heart failure[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(10): 2023-2035
- 4 A Moehizuki M, Yano M, Oda T, et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca^{2+} leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(16): 1722-1732
- 5 Pei J J, Khatoon S, An W L, Nordlinger M, et al. Role of protein kinase b in alzheimer's neurofibrillary pathology[J]. Acta Neuropathol, 2003, 105(4): 381-392 (收稿: 2010-01-18)
(修回: 2010-04-07)

生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量

张国龙 石瑞如 张霞 王伟 秦殊 彭志刚 付光宇

摘要 目的 建立生物荧光技术检测结核分枝杆菌 ATP 含量的方法并观察几种抗结核药物(异烟肼, 利福平, 乙胺丁醇, 链霉素, 卡那霉素)的作用。**方法** 结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的菌悬液, 经高温裂解, 提取 ATP, 用生物荧光技术检测 ATP 含量。条件稳定后, 观察菌数和 ATP 浓度的关系, 以及加入不同浓度的抗结核药物后 1 周之内 ATP 的动态变化。**结果** 菌液加入裂解液后 100℃煮沸 8min, 迅速降至室温, 加入荧光素酶, 3~5min 时测荧光值。按上述步骤提取和测定时菌数和 ATP 浓度成正比关系。含药液体培养情况: 随药物浓度增加, ATP 量下降, 培养至第 7 天时, 药物的敏感性可以初步进行判断。**结论** 所建立的生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量, 具有简便、快速、敏感、可重复性强等特点, 有望成为结核菌体外药敏试验的一种有用的方法。

基金项目: 河南省医学科技攻关项目(2006149)

作者单位: 450008 郑州, 河南省胸科医院检验科(张国龙、石瑞如、张霞、王伟、秦殊); 上海美全生物科技有限公司(彭志刚); 郑州市安图绿科生物有限公司(付光宇)

通讯作者: 张国龙, 电子信箱: guolongzhang@hotmail.com

关键词 结核菌 三磷酸腺苷 生物发光法 药物敏感性试验

Bioluminescence Assay in ATP of Mycobacterium Tuberculosis. Zhang Guolong, Shi Ruiru, Zhang Xia, Wang Wei, Qin Shu, Peng Zhigang, Fu Guangyu. Clinical Laboratory of Henan Provincial Chest Hospital, Henan 450003, China

Abstract Objective To monitor mycobacterial growth by bioluminescence assay of mycobacterial ATP and to analyze the susceptibility of several antituberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, kanamycin). **Methods** ATP was extracted from the bacterial suspension prepared from mycobacterium tuberculosis H37Rv and measured by bioluminescent assay. The relationship between ATP contents and the number of bacteria was evaluated. The ATP contents of H37Rv inoculated into the Middlebrook 7H9 broth medium containing antituberculosis agents were measured at days of 0, 3, 5 and 7. **Results** The highest relative light units (RLU) was obtained when ATP was extracted with lysis buffer at 100℃ boiling for 8 minutes and then decreased quickly to room temperature. 3 ~ 5 minutes after adding bioluminescence enzyme was found to be the proper time for RLU test. The ATP contents correlated well with the number of bacteria. The control culture showed the time - dependent increase in the RLU values, while cultures supplemented with antimicrobial agents reduced their ATP contents concomitant with the concentrations of drugs. **Conclusion** The bioluminescence assay of mycobacterial ATP established in this work is simple, rapid, sensitive and highly reproducible and may be useful for drug susceptibility assessment in Mycobacterium tuberculosis.

Key words Mycobacterium tuberculosis; Adenosine triphosphate; Bioluminescent assay; Drug susceptibility test

世界卫生组织 2009 年统计数据表明,中国是全球第 2 位的结核病高负担国家,每年新发病例 130 万^[1]。耐多药结核和广泛耐药结核的传播是我国结核病控制中的一大难题^[2,3]。由于结核菌生长缓慢,常规药敏试验耗时长,需 2 ~ 3 个月,影响了耐药结核病的早期诊断和合理治疗方案的制定^[4],因此很有必要探索一些快速药敏试验的方法。ATP 是活细胞内的一种特殊的能量载体,国际上通常用 ATP 的检测来判断活的微生物水平。本研究即是以生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量并观察抗结核药物的影响,为进一步药敏试验的建立奠定基础。

材料与方法

1. 菌株情况:本院检验科冻存的结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv (ATCC25618),先在改良罗氏培养基上 37℃ 培养 3 周,菌块研磨后置液体培养基 Middlebrook 7H9 内混悬,调整到麦氏浊度 0.5 ~ 1.5 后,于 37℃ 培养 5 天时使用。

2. 试剂与仪器:荧光检测仪 (Hygiena International 公司产品, Pi-102 型),裂解液,荧光素酶为其配套产品。

3. ATP 测定方法:菌液 50μl,加入 50μl 裂解液,100℃ 水浴煮沸 8min 后,迅速降至室温,转移入专用测试管中,加入 100μl 荧光素酶,混匀,3 ~ 5min 时测试荧光值 (relative light units, RLU)。

4. ATP 药敏试验法初步探索:同样浓度的菌液分成若干份,各 50μl,分别加入异烟肼 (INH),利福平 (RFP),乙胺丁醇 (EMB),链霉素 (SM),卡那霉素 (KM) 5 种药物,每种药物各设 3 种浓度和空白对照,INH (0μg/ml, 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml), RFP (0μg/ml, 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml), EMB (0μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml, 10.0μg/ml), SM (0μg/ml, 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml), KM (0μg/ml, 0.1μg/ml, 1.0μg/ml, 10.0μg/ml)。

ml, 1.0μg/ml, 10.0μg/ml)。37℃ 培养 0、1、3、5、7 天时分别用上述方法测定 ATP 值。

结 果

1. 结核分枝杆菌 ATP 提取条件的探讨:菌液 50μl 加入裂解液 50μl,混匀后,分别置于 25℃、45℃ 和 100℃ 水浴 8min,然后降至室温,加入 100μl 荧光素酶,混匀,于 0 时刻及每分钟测试 1 次 RLU 值,直至 12min。100℃ 水浴又分为两组,一组为煮沸裂解后迅速降至室温,另一组为煮沸裂解后迅速冰浴,保存于 0℃。各组的荧光值 RLU 随时间变化情况见图 1。图 1 中 A 为 25℃ + 室温, B 为 45℃ + 室温, C 为 100℃ + 冰浴, D 为 100℃ + 室温。可见 ATP 提取的最佳条件为 100℃ 煮沸裂解 8min 后迅速降至室温,加入荧光素酶 100μl 后 3 ~ 5min 时进行测定。

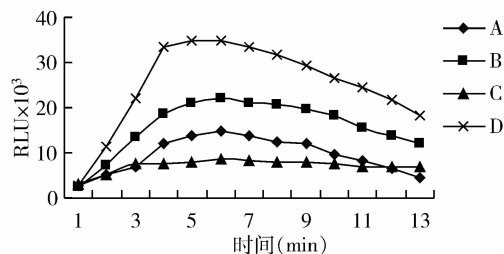


图 1 不同提取条件下荧光值 (RLU) 随时间的变化

2. 菌量与 ATP 含量的关系探讨: H37Rv 菌液 (浊度 1.0 麦氏单位), 用 7H9 培养基 10 倍进行等比例稀释成为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 浓度, 分别按上述最佳提取方法提取并测定 ATP 的荧光值。可见 RLU 与菌量成正比关系 (图 2)。

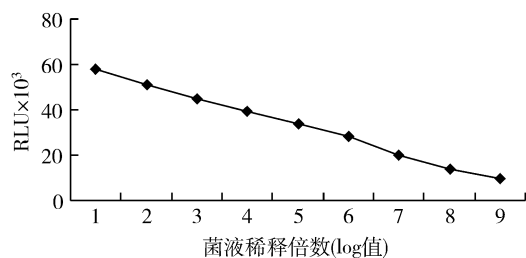


图2 菌量与 ATP 含量的关系

3. 不同浓度的药物对 ATP 含量的影响(药物敏感性试验的初步探讨): INH、RFP、EMB、SM、KM5

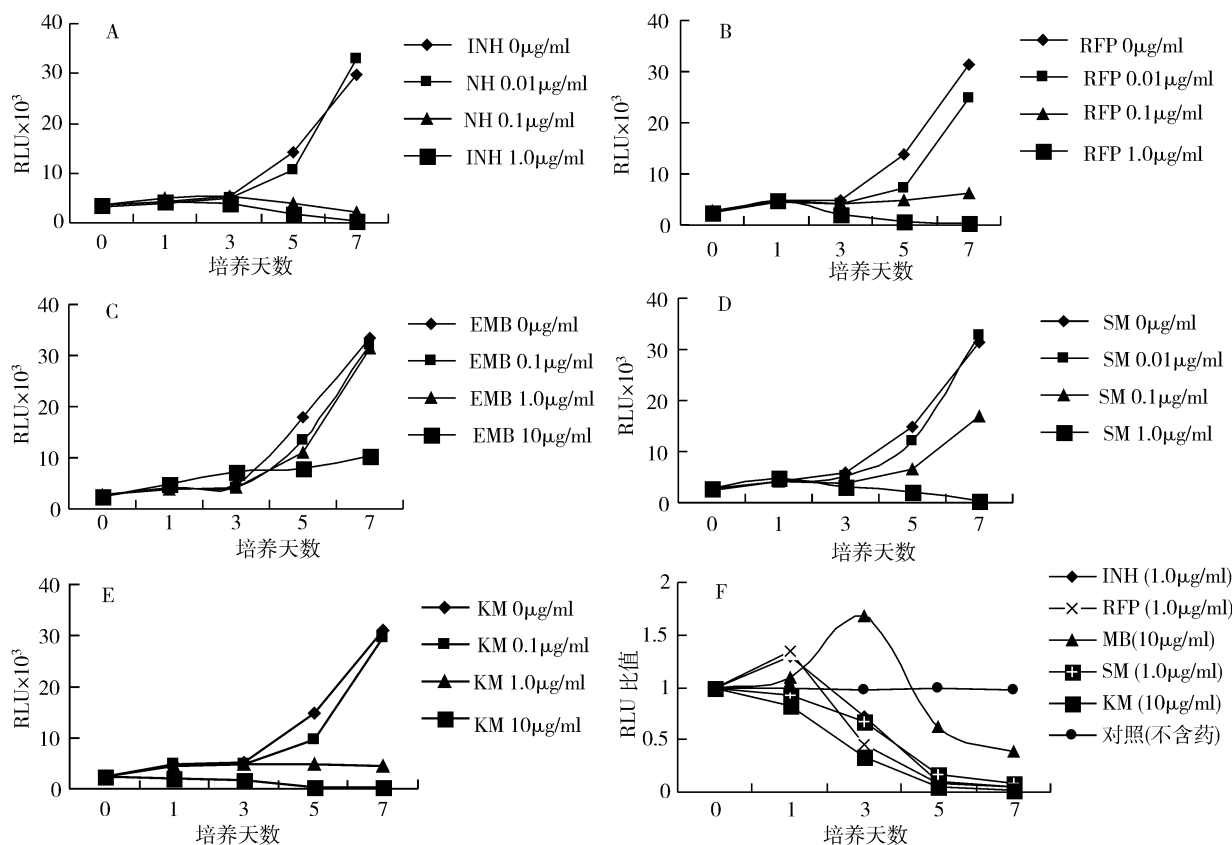


图3 不同浓度的药物对结核分枝杆菌 H37Rv 生长的抑制作用

A. INH (μg/ml); B. RFP (μg/ml); C. EMB (μg/ml); D. SM (μg/ml); E. KM (μg/ml); F. 5 种药物在培养过程中对 RLU 值降低比值的影响

讨 论

结核分枝杆菌常规药敏试验耗时长,远远不能满足临床需要。近年来,一些新的方法探索层出不穷^[5,6]。分子生物学方法如测序法^[7],基因芯片法^[8],变性高效液相色谱法^[9~11]等虽然快速,灵敏,但均需要昂贵的设备,严重影响了其临床应用。ATP 的检测开始于 20 世纪 50 年代,目前已经在基础生物学,生物代谢,以及微生物的快速检测,肿瘤细胞的药敏试验等方面得到广泛的应用^[12,13]。ATP 作为生物

种药物分别存在时,结核分枝杆菌 H37Rv 的培养天数和 RLU 值的测定结果见表 3。不含药物的菌液,RLU 值随培养天数的增加而增加。含药物的菌液,RLU 值随药物浓度的增加而降低(图 3A、B、C、D、E)。以各药物组所采用的最大浓度来分析,以各培养天数时的含药 RLU 值与不含药物的 RLU 值的比值为观察对象所做的曲线见图 3F。结核分枝杆菌 H37Rv 为各种药物全敏感株,由表 3 F 可知,如果判断标准设为 RLU 比值大于 0.5 为耐药,小于 0.5 为敏感,那么加入药物后需要 7 天即可判断结果。

代谢所必须的能量,可以综合反映生物体的生物活性,成为指示细胞活性和活细胞数量的良好指标。结核分枝杆菌 ATP 测定国外有文献报道,国内报道很少。本研究建立了生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量并在药物敏感性试验中进行了初步的探讨,所建方法稳定、简便、成本低、可操作性强。我们正在观察临床结核分枝杆菌分离株(敏感株和耐药株)中的应用效果,今后目标是探索痰、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液等生物样本中该方法的应用,旨在将结核

菌药敏试验由常规的 3 个月缩短到 1 周之内,尽早为临床提供药敏信息。生物样本的检测,如何充分有效地防止其他细菌的污染将会成为技术关键。

参考文献

- 1 Glaziou P, Floyd K, Raviglione M. Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med*, 2009,30:621 – 636
- 2 Wang LX. Status and prospects of multidrug – resistant tuberculosis control in China. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*,2009,32:561 – 563
- 3 He GX, Zhao YL, Jiang GL, *et al.* Prevalence of tuberculosis drug resistance in 10 provinces of China. *BMC Infect Dis*, 2008,11:166 – 169
- 4 Al – Zamel FA. Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009,7:1099 – 1108
- 5 Reves RR, Burman WJ. Sorting out icebergs, mirages, and clinical tuberculosis during active case finding. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009,180:1167 – 1169
- 6 Rosales S, Pineda – Garcia L, Andino N, *et al.* Evaluation of the nitrate reductase assay for rapid detection of extensively drug – resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*,2009,13:1542 – 1549
- 7 Cho EH, Bae HK, Kang SK, *et al.* Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of *katG*, *inhA*, and *rpoB* genes in Korea. *Korean J Lab Med*, 2009,29:455 – 460
- 8 Guo Y, Zhou Y, Wang C, *et al.* Rapid accurate determination of

- multidrug resistance in *M. tuberculosis* isolates and sputum using a biochip system. *Int J Tuberc Lung Dis*,2009,13:914 – 920
- 9 Shi R, Otomo K, Yamada H, *et al.* Temperature – mediated heteroduplex analysis for the detection of drug – resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes Infect*,2006,8:128 – 135
- 10 Shi R, Zhang J, Li C, *et al.* Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high – pressure liquid chromatography and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*,2006,44:4566 – 4568
- 11 Shi R, Zhang J, Li C, *et al.* Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. *Microbes Infect*, 2007,9:1538 – 1544
- 12 Kim S, Schuler B, Terekhov A, *et al.* A bioluminescence – based assay for enumeration of lytic bacteriophage. *J Microbiol Methods*, 2009,79:18 – 22
- 13 Ivancic V, Mastali M, Percy N, *et al.* Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol*, 2008,46:1213 – 1219

(收稿:2009 – 12 – 30)

(修回:2010 – 04 – 07)

补肾益气法治疗慢性再生障碍性贫血的临床研究

陈志炉 周郁鸿 魏克民 沈建平 沈一平 蒋慧芳

摘要 目的 观察补肾益气中药联合西药治疗慢性再生障碍性贫血(CAA)的临床疗效。**方法** 将 76 例患者随机分为两组,治疗组用补肾益气中药联合雄激素、环孢素治疗,对照组单用西药治疗。**结果** 治疗组基本治愈 9 例,缓解 13 例,明显进步 11 例,总有效率 82.5%;对照组基本治愈 4 例,缓解 11 例,明显进步 9 例,总有效率 55.56%。两组疗效比较有显著性差异($P < 0.025$)。**结论** 补肾益气法联合雄激素、环孢素治疗慢性再生障碍性贫血临床疗效较好。

关键词 慢性再生障碍性贫血 补肾益气法 雄激素 环孢素

Clinical Study on Treatment of Chronic Aplastic Anemia with Method of Invigorating the Kidney and Qi. *Chen Zhilu, Zhou Yuhong, Wei Keming, et al. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310006, China*

Abstract Objective To observe the clinical effect of herbs of invigorating the kidney and qi combined with western medicine in patients with chronic aplastic anemia. **Methods** 76 patients with chronic aplastic anemia were randomly divided into two groups. 40 patients in treatment group were treated with method of invigorating the kidney and qi herbs combined with Androgen and Cyclosporine A. 36 patients in control group were treated with Androgen and Cyclosporine A. **Results** The total effective rate of the treatment group reached 82.5%, while the control group reached 55.56%. The test results showed significantly difference between these two groups($P < 0.025$). **Conclusion** The clinical effect on patients with chronic aplastic anemia treated by method of invigorating the kidney and qi

基金项目:浙江省科技厅资助课题(2006C23039);浙江省中医药重大疾病科技创新平台项目(2009ZDJB01 – 06)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院(陈志炉、魏克民、蒋慧芳);310006 浙江中医药大学附属医院(周郁鸿、沈建平、沈一平)

通讯作者:周郁鸿,电子邮箱:ZYHb1ood@163.com