

地预防、控制疫情及治疗做准备。由于有些临床样品病毒数量极少,浓度极低,难以直接检测,参考目前提高环境水体中的病毒浓度的方法^[8],对样品中 H1N1 流感病毒的浓集采取免疫学反应法和免疫吸附法。其中免疫学方法(抗原抗体反应)其敏感性非常高、特异性强、操作简便;免疫吸附法在免疫学方法的基础上进一步浓集病毒,使检测的敏感性更高、特异性更强。通过富集,增加了病毒量,浓缩并纯化了检测的病毒样品,排除了干扰。对用于 PCR 方法检测的样品,消除了抑制物的影响^[9]。在本实验中有两个特异性选择过程,一是抗原-抗体的特异性免疫结合。另一个是 Protein A/G 与抗原-抗体免疫复合物的又一次特异性结合,保证了抗原样品的纯度及灵敏度,减少了非特异性,降低了检测结果的假阴性,提高了 RT-PCR 检测的灵敏度。实验中选择 Protein A/G,是利用其特性来富集、浓缩病毒以提高检测的灵敏度。Protein A/G 是使用 Protein A 与 Protein G 的抗体结合结构域融合后的重组蛋白和树脂偶联制成。由于 Protein A/G 连接所有人类 IgG 亚类、还有 IgA、IgE、IgM 及少量的 IgG,且连接不受环境条件 pH 的影响。Protein A/G 使用多位点交联技术,稳定性好、特异性高并具有广谱结合力,每毫升基质可特异性结合 6~10mg 抗体。

由结果可知,对样品直接 RT-PCR,其检测的稀释度仅约 10^{-2} (1:500),当采用 H1N1 特异性血清免疫沉淀病毒后,其检测的稀释度提高至 10^{-5} ,而用特异性血清与 Protein A/G 联合使用,其检测的稀释度

达 10^{-6} ,检测的灵敏度又提高 10 倍,所采用的病毒富集方法效果是显著的,说明通过用富集病毒的方法,使检测灵敏度得到提高,有可能为 H1N1 病毒分子检测提供新的思路和方法依据,同时也为其他 RNA 病毒的分子检测提供新的模式。

参考文献

- 1 卢锦汉,章以浩,赵锐. 医学生物制品学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:642-651;2 版,2007:805-810
- 2 陆学东. 临床常见呼吸道病毒及其实验室诊断技术[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(8):956-960
- 3 Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, *et al.* Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J Clin Microbiol, 1995,33:318-321
- 4 Doller G, Schuy W, Tjhen KY, *et al.* Direct detection of influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding. J Clin Microbiol, 1992,30:866-869
- 5 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年试行版第 1 版)[J]. 传染病信息,2009,22(3):I~III
- 6 贾菲综述,高宝荣,朱春玉,等. 高致病性禽流感病毒实验室检测方法研究进展[J]. 国际病毒学杂志,2009,16(2):39-43
- 7 王四全,吴俊,曹玉广. 水体中病毒富集方法研究进展[J]. 中国公共卫生,2009,25(11):1287-1289
- 8 陈小岳,田海林. 水体肠道病毒的浓集及核酸检测方法的应用[J]. 职业与健康,2007,23(4):293-295
- 9 陈军红,周志军,张林,等. 空气和水环境中病毒的富集与检测研究进展[J]. 中国公共卫生,2005,21(4):502-504

(收稿:2010-01-29)

(修回:2010-04-05)

虎杖苷吸入剂对哮喘大鼠模型炎性细胞的影响

江庆澜 雷秀霞 梁颜笑 刘桂长 巫小莉 梁成结 连家燕

摘要 目的 分析虎杖苷吸入剂对支气管哮喘大鼠模型的干预效果。**方法** 以 10% 的卵蛋白(OVA)和 3% 的氢氧化铝混合液腹腔注射实验大鼠 2 次致敏,然后以 2% 的 OVA 诱喘并进行虎杖苷和氨茶碱干预及生理盐水对照实验两周。观察实验大鼠诱喘和药物干预后的行为变化和肺组织切片、检测各组大鼠心室血中白细胞(WBC)、嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜碱性粒细胞(BASO)、中性粒细胞(NEUT)和淋巴细胞(LYM)的数量变化。**结果** 在诱喘过程中,虎杖苷干预组大鼠的哮喘症状得到明显改善,虎杖苷干预组大鼠 EOS、LYM 和 MONO 数量[(0.1339±0.01794)×10⁹/L,(6.5440±0.49530)×10⁹/L,(0.2148±0.08287)×10⁹/L]较哮喘对照组大鼠的 EOS、LYM 和 MONO[(0.1948±0.02454)×10⁹/L,(8.0090±0.71166)×10⁹/L,(0.2946±0.14257)×10⁹/L]有所下降($P<0.05$, $P>0.05$, $P>0.05$),且与正常对照组水平(0.1257±0.02454,6.9610±0.97243,0.1974±

基金项目:广州市医药卫生科技项目(2008-YB-027);广州市中医药、中西医结合科技项目(2009-A-05)

作者单位:510180 广州市第一人民医院(江庆澜,雷秀霞,梁颜笑,刘桂长,巫小莉);510182 广州医学院(梁成结,连家燕)

0.11765)接近。**结论** 虎杖苷干预能够有效改善哮喘大鼠模型的哮喘症状。

关键词 支气管哮喘 虎杖苷 炎症细胞 干预

Effects of Polydatin Inhalation on Inflammatory Cells in Asthmatic Rat Model. Jiang Qinglan, Lei Xiuxia, Liang Yanxiao, Liu Guichang, Wu Xiaoli, Liang Chengjie, Lian Jiayan. The First People's Hospital of Guangzhou, Guangdong 510180, China

Abstract Objective To detect the effects of the polydatin intervention in bronchial asthma rats. **Methods** The rats were injected with 1ml of the mix solution of 10% OVA and 3% aluminum hydroxide twice. And then, they were induced bronchial asthma with 2% OVA, and intervened with the polydatin solution and aminophyllin injection or controlled with saline for 2 weeks. The rat actions in inducing and intervening the asthma, and the rat lung session slides were observed. The numbers of WBC, EOS, BASO, NEUT and LYM in the ventricle blood were calculated. **Results** Polydatin intervention could obviously improve the asthmatic symptom. The number of EOS, LYM and MONO in the polydatin intervenient group (0.1339 ± 0.017946 , 5440 ± 0.49530 , 0.2148 ± 0.08287) were lower than those in asthmatic group (0.1948 ± 0.02454 , 8.0090 ± 0.71166 , 0.2946 ± 0.14257 ; $P < 0.05$, $P > 0.05$, $P > 0.05$), and decreased to normal level in control group (0.1257 ± 0.02454 , 6.9610 ± 0.97243 , 0.1974 ± 0.11765). **Conclusion** The polydatin can significantly improve the asthmatic symptom of rat models.

Key words Bronchial asthma; Polydatin; Inflammatory cell; Intervention

支气管哮喘是具有高发病率和病死率的常见病,是一种以嗜酸性粒细胞(EOS)浸润为主的气道过敏反应,其发病机制极为复杂,中医认为哮喘之证为内伤和外感所致,西医指出该病大多是在遗传的基础上受到某些体内外因素而激发,具体发病机制至今尚未完全清楚,有限的治疗方法和疗效成为影响哮喘患者生存质量和预后的重要因素。中药虎杖性味苦寒,归肝胆肺经,对呼吸系统的影响在于镇咳和平喘作用,虎杖提取物具有抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)基因表达的功效,而 TNF- α 作为一种前炎症因子是哮喘发生和发展的重要因素^[1,2]。虎杖的主要化学成分虎杖苷具有止咳、平喘、祛痰、抗菌、清除自由基、调血脂和降胆固醇等功效,目前主要应用于心血管疾病、感染性炎症、休克治疗、调控细胞生长以及抑制细胞内的过氧化,在动物溶血、过敏和刺激试验均无不良反应^[3,4]。迄今为止,尚无有关虎杖及其提取物对哮喘治疗作用机制的报道。本项研究采用虎杖苷吸入剂干预哮喘大鼠模型,通过心室炎炎症细胞分类计数方法探讨虎杖苷对实验大鼠的影响,探讨虎杖苷对哮喘的疗效及其作用机制。

材料与方法

1. 药品和试剂:卵蛋白(OVA, Sigma, Z010101),虎杖苷(西安和霖生物工程有限公司),氨茶碱(广州白云山明兴制药有限公司),Cell-DYN3500 and 3700 Systems 试剂盒(雅培,Sheath 6635112, Diluent 6755812, Detergent 6385212, HGB/WICLYSE 6495912)。

2. 哮喘大鼠模型:清洁级雌性 SD 大鼠 40 只,体重 140 ~ 160g,由广东省医学实验动物中心提供。实验大鼠分为 4 组,

每组 10 只,包括正常对照组、哮喘对照组、氨茶碱干预组和虎杖苷干预组。各组大鼠均以标准饲料喂养,自由饮食。哮喘对照组、虎杖苷干预组和氨茶碱干预组大鼠首日致敏采用 1 毫升/只剂量进行腹腔内和皮下注射 10% OVA 和 3% 氢氧化铝混合液,时隔 1 周后,在第 8 天以相同剂量、相同方法加强致敏 1 次。正常对照组以等量生理盐水进行腹腔和皮下注射。

3. 药物干预和对照:致敏后第 15 天,将大鼠置于雾化箱内,采用雾化器(PRONEB, PARI37V0160)对虎杖苷干预组、氨茶碱干预组和哮喘对照组大鼠分别进行虎杖苷[50mg/(kg·d)]、氨茶碱[25mg/(kg·d)]和生理盐水的雾化吸入 30min,时隔 1h 后,再以 2% OVA 雾化诱喘 30min,正常对照组则以生理盐水进行雾化吸入。隔天 1 次,连续 7 次,共 2 周。以哮喘对照组大鼠出现呼吸加快、口唇发绀、腹肌痉挛、点头呼吸及站立不稳等表现为激发成功。

4. 标本采集和处理:各组大鼠均于末次激发 24h 内,以 7% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉,解剖,从左心室取血 1ml,注入 EDTA 抗凝管作炎症细胞计数用,切取部分左肺上叶以 4% 的甲醛固定作病理切片用,其余肺组织立即存放于 -80℃ 冰箱保存,供 RT-PCR 使用。

5. 肺组织作 HE 染色,在光学显微镜(LEICA, ASLMD)下以 630X 观察并摄影。

6. 炎症细胞分类和计数:采用 Cell-DYN3500 and 3700 Systems 试剂盒并按使用说明处理血液标本,以全自动血球计数仪(雅培 CD3700)进行血细胞分类、计数,分析结果自动记录 and 输出。

7. 数据的统计分析:采用成对双样本平均值分析的 t 检验方法,比较各组数据间的差异,当 $P < 0.05$ 时,可认为具有显著的统计差异。

结 果

根据实验大鼠诱喘反应及行为观察,哮喘对照

组、虎杖苷干预组和氨茶碱干预组实验大鼠经 10% 的卵蛋白和 10% 的氢氧化铝致敏的 14 天内,形态行为正常。其后用 2% 的卵蛋白喷雾激发大鼠哮喘发作期间,可明显观察到哮喘对照组大鼠呼吸急促、腹肌痉挛、点头和站立不稳等症状,间歇听闻大鼠的哮喘音。氨茶碱干预组大鼠则哮喘症状较轻,偶有呼吸急促。未见虎杖苷干预组大鼠呼吸困难得症状。正常对照组大鼠行为正常。全自动血球计数仪自动输出的

炎性细胞分类数据显示(表 1 和表 2),哮喘对照组的白细胞(WBC)、嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(NEUT)、淋巴细胞(LYM)和单核细胞(MONO)数均比正常对照组增高,其中 EOS 数量显著增加($P < 0.05$)。虎杖苷干预对比于氨茶碱更能有效降低 EOS($P < 0.05$)和 LYM($P > 0.05$)的数量。哮喘对照组的嗜碱性粒细胞(BASO)低于正常对照组,虎杖苷和氨茶碱干预使得 BASO 进一步下降($P > 0.05, P > 0.05$)。

表 1 各组实验大鼠炎性细胞的分类计数结果($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)

项目	虎杖苷干预组	氨茶碱干预组	哮喘对照组	正常对照组
WBC	8.2850 $\pm$ 0.64012	6.7362 $\pm$ 0.96150	10.7470 $\pm$ 1.04925	9.7430 $\pm$ 1.39984
EOS	0.1339 $\pm$ 0.01794	0.1371 $\pm$ 0.03398	0.1948 $\pm$ 0.02454	0.1257 $\pm$ 0.02454
BASO	0.3938 $\pm$ 0.14759	0.2384 $\pm$ 0.10519	0.5203 $\pm$ 0.25039	1.7440 $\pm$ 0.57160
NEUT	0.9995 $\pm$ 0.26678	0.6239 $\pm$ 0.14030	1.7358 $\pm$ 0.37307	0.6346 $\pm$ 0.30898
LYM	6.5440 $\pm$ 0.49530	12.8316 $\pm$ 7.11612	8.0090 $\pm$ 0.71166	6.9610 $\pm$ 0.97243
MONO	0.2148 $\pm$ 0.08287	0.0386 $\pm$ 0.01048	0.2946 $\pm$ 0.14257	0.1974 $\pm$ 0.11765

表 2 各组实验大鼠炎性细胞计数的 *t* 检验结果

项目	正常对照组:哮喘对照组		氨茶碱干预组:哮喘对照组		虎杖苷干预组:哮喘对照组	
	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
WBC	0.532	0.608	3.151	0.012	2.191	0.056
EOS	2.312	0.046	1.540	0.158	2.353	0.043
BASO	1.746	0.115	0.928	0.377	0.477	0.644
NEUT	2.213	0.054	3.028	0.014	1.525	0.161
LYM	0.750	0.472	0.699	0.502	1.739	0.116
MONO	0.518	0.617	1.770	1.111	0.517	0.582

各组实验大鼠肺组织病理切片观察结果显示(封三彩图 15 ~ 彩图 18),哮喘对照组肺组织出现明显的各种炎症细胞浸润,虎杖苷和氨茶碱干预使得实验大鼠肺组织的炎症细胞浸润状况有所改善。

讨 论

支气管哮喘的发作是气道综合性的病理变化的结果,EOS、NEUT、LYM、BASO、肥大细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞、气道上皮细胞等多种细胞和细胞组分参与气道变态炎症的发生和发展过程,其中以 EOS 浸润为主^[5],EOS 在支气管黏膜中的浸润和哮喘的严重程度密切相关。免疫炎性细胞作为某一发病阶段的效应细胞,又作为下一阶段的起始细胞,彼此相互作用和相互制约,导致大量的细胞因子的产生并作用于效应器官,从而引起哮喘发作^[6]。其他研究显示,哮喘发作时,患者的外周血及气道内 EOS 均明显增多,当病情改善,随着 EOS 凋亡,其数量便明显下降,EOS 在气道局部的聚集与特异性 EOS 趋化因子 Eotaxin,RANTES 及 IL-4、IL-5、IL-8 等有关^[7-9]。

NEUT 与变应性炎症有关,NEUT 可释放白三烯、前列腺素和血小板激活因子等,并引起肥大细胞再次释放炎性介质^[6]。

本研究对实验大鼠的哮喘行为观察结果表明,以 10% 卵蛋白和 3% 氢氧化铝致敏大鼠,再以 2% OVA 喷雾最能有效诱喘,其间,哮喘对照组实验大鼠出现呼吸加快、口唇发绀、腹肌痉挛、点头呼吸及站立不稳等哮喘症状,静息期间可听闻哮喘大鼠有明显的哮喘音。炎性细胞分类计数的结果显示,致敏大鼠经 OVA 致敏和诱喘后 EOS、NEUT、LYM 和 MONO 数目均比正常对照组增高,其中,EOS 显著增加。这表明,EOS、NEUT、LYM 和 MONO 等炎性细胞的增加与哮喘的发作有着密切关系,其中 EOS 数量显著变化可视为判定哮喘模型制造和药物平喘效用成功与否的一个重要指标。在药物干预实验中,虎杖苷对比于氨茶碱更能有效地使哮喘大鼠血中的 EOS、LYM 和 MONO 数量下降到接近正常对照组的水平,而且,虎杖苷干预组大鼠肺组织切片所观察到 EOS 的数量也

较氨茶碱干预组的为少。诱喘后,虎杖苷干预组大鼠相比于氨茶碱干预组大鼠相应的症状轻微,不见其呼吸困难,静息期间也无哮鸣音。研究结果显示,虎杖苷吸入剂具有平喘疗效,能够有效改善大鼠模型的哮喘症状。

参考文献

- 1 张骅,刘琨.虎杖临床应用研究进展.临床肺科杂志,2007,12(1):62-63
- 2 江庆澜,李瑜元,潘锦瑶,等.虎杖提取液对非酒精性脂肪肝大鼠肿瘤坏死因子 α 基因表达的影响.中药材,2005,28(10):917-919
- 3 伍晓春.虎杖的药理作用及临床应用研究进展.中医药信息,2005,22(2):22-25
- 4 许雄伟,邱光清,李美珠,等.虎杖苷注射液的溶血、过敏及刺激

试验.中药新药与临床药理,2008,19(3):174-177

- 5 Saetta M, Turato G. Airway pathology in asthma. Eur Respir J Suppl 1, 2001, 34:18-23
- 6 林耀广.支气管哮喘发病机制的新认识.当代医学,2009,6(9):17-31
- 7 Matthew SH, Sankar G. Signaling to NF- κ B. Genes and Development, 2004, 18: 2195-2224
- 8 朱述阳,吕丽丽,夏春伟,等. Eotaxin 和 CCR3 在哮喘豚鼠肺和骨髓组织的表达和调控.细胞与分子免疫学杂志,2007,23(6):543-545
- 9 方向明,王军.平喘宁对哮喘豚鼠肺组织中嗜酸性粒细胞趋化因子 mRNA 表达的影响.中华中医药杂志,2007,22(1):55-57

(收稿:2010-01-15)

(修回:2010-04-07)

尿液中转化生长因子 β_1 和层粘连蛋白含量与乳腺癌的相关性研究

陈东祥 许汝青 盛波 陈洪俊

摘要 目的 探讨尿液中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 和层粘连蛋白(LN)与乳腺浸润性导管癌的相关性。方法 采用夹心法酶联免疫吸附技术(ELISA)分别检测 60 例乳腺癌患者、32 例乳腺良性疾病患者及 32 例健康对照者尿液 TGF- β_1 及 LN 的含量。结果 乳腺癌组尿液 LN 含量高于良性病变组和对照组,差异均有显著性($P < 0.05$),乳腺癌组尿液 TGF- β_1 含量与良性病变组和对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$)。但在乳腺癌进展期患者尿液 TGF- β_1 含量均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。等级相关分析:尿液 TGF- β_1 和 LN 含量与临床分期和淋巴结转移状况呈显著性正相关($r = 0.598/0.560, P = 0.001; r = 0.647/0.602, P = 0.000/0.000$);与雌激素受体、C-erbB-2 呈负相关($r = -0.263/-0.311, P = 0.042/0.016; r = -0.288/-0.330, P = 0.026/0.010$)。结论 乳腺癌患者尿液中 TGF- β_1 及 LN 含量与临床分期和淋巴结转移状况呈正相关,提示 TGF- β_1 和 LN 与乳腺癌的病理机制及浸润、转移等生物学行为有密切关系。

关键词 尿液 转化生长因子 β_1 层粘连蛋白 乳腺肿瘤

Correlation between Urine Levels of Transforming Growth Factor β_1 and Laminin and Breast Cancer. Chen Dongxiang, Xu Ruqing, Sheng Bo, et al. Department of Oncosurgery, The First Affiliated Hospital of Yangtze University, Hubei 434002, China

Abstract Objective To investigate the relationship between urinary transforming growth factor β_1 and laminin levels and breast cancer. **Methods** The urine levels of TGF- β_1 and LN were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in 60 patients with breast cancer, 32 patients with breast benign disease, and 32 healthy controls. **Results** The urine level of LN of the breast cancer group was significantly higher than those of the breast benign disease group and the control group ($P < 0.05$). Comparing the breast benign disease group and control group with the breast cancer group, the urine level of TGF- β_1 had no significant difference ($P > 0.05$). However, the urine levels of TGF- β_1 in patients with more advanced were significantly higher ($P < 0.05$). In Spearman rank correlation analysis, the urine levels of TGF- β_1 and LN were significantly positive correlated with the clinical stage and lymph node status ($r = 0.598/0.560, P = 0.001; r = 0.647/0.602, P = 0.000/0.000$), and meanwhile they were significantly negative correlated with the ER and C-

基金项目:湖北省荆州市科技发展计划项目(20071PE1-34)

作者单位:434002 荆州,长江大学附属第一医院肿瘤外科

通讯作者:陈东祥,电子信箱:chendongxiang7268@yahoo.com.cn