

0、7、14、21、28 天尿蛋白变化,并观察血生化指标及肾脏病理变化以及肾脏组织 HPA、HSPG 与 PDGF、bFGF 表达的改变。结果显示,造模后第 14 天开始 24h 尿蛋白定量进行性升高,并与 HPA 表达呈正相关,与 HSPG 表达呈负相关,同时观察到 AN 组大鼠肾组织 PDGF 表达明显增多,并与尿蛋白呈负相关,提示 PDGF 在 AN 组大鼠模型中具有重要的病理作用;但本实验中 AN 模型大鼠肾组织 bFGF 表达未见显著改变。

HPA 表达增加及活性增强在肾小球疾病蛋白尿发生发展中具有重要病理作用,已有报道 HPA 抑制剂具有抗凝、抗细胞增殖活性,减少炎症细胞浸润,抑制肾素-血管紧张素系统活性,减少蛋白尿,延缓肾纤维化进展,有可能成为治疗肾小球疾病蛋白尿的重要作用靶点^[13,14]。

参考文献

- 1 Van den Hoven MJ, Rops AL, Vlodavsky I, *et al.* Heparanase in glomerular diseases[J]. *Kidney Int*, 2007, 72(5):543-548
- 2 Szymczak M, Kuzniar J, Klinger M. The role of heparanase in diseases of the glomeruli[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010, 58(1):45-56
- 3 Wijnhoven TJ, van den Hoven MJ, Ding H, *et al.* Heparanase induces a differential loss of heparan sulphate domains in overt diabetic nephropathy[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(2):372-382
- 4 Nasser NJ. Heparanase involvement in physiology and diseases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(11):1706-1715
- 5 van den Hoven MJ, Waanders F, Rops AL, *et al.* Regulation of glomerular heparanase expression by aldosterone, angiotensin II and re-

- active oxygen species[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(9):2637-2645
 - 6 Wijnhoven TJ, Lensen JF, Rops AL, *et al.* Anti-proteinuric effects of glycosaminoglycan-based drugs[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2007, 9(4):364-377
 - 7 Harvey SJ, Miner JH. Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(4):393-398
 - 8 Nadir Y, Brenner B, Fux L, *et al.* Heparanase enhances the generation of activated factor X in the presence of tissue factor and activated factor V II [J]. *Haematologica*, 2010, 95(11):1927-1934
 - 9 Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A. The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP[J]. *Int J Biochem cell Biol*, 2006, 38(9):1463-1468
 - 10 Patel VN, Knox SM, Likar KM, *et al.* Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis [J]. *Development*, 2007, 134(23):4177-4186
 - 11 Edovitsky E, Lerner I, Zcharia E, *et al.* Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity [J]. *Blood*, 2006, 107(9):3609-3616
 - 12 Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4):255-273
 - 13 Gambaro G, Kong NC. Glycosaminoglycan treatment in glomerulonephritis? An interesting option to investigate[J]. *J Nephrol*, 2010, 23(3):244-252
 - 14 Ferro V, Dredge K, Liu L, *et al.* PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis [J]. *Sem Thromb Hemost*, 2007, 33(5):557-568
- (收稿:2011-03-21)
(修回:2011-05-17)

血浆内毒素定量检测的临床应用价值探讨及参考值范围的调查

余玲玲 王国胜 杨锦红 刘建平 吴秀继

摘 要 目的 探讨血浆内毒素定量检测的临床应用价值,并建立温州健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围。**方法** 采用动态浊度法定量检测 242 例不明原因发热(fever of unknown origin, FUO)患者和 252 例健康受检者血浆内毒素浓度,用 SPSS 13.0 软件对其结果进行统计学分析,并采用 95% 可信区间确定其参考值范围。**结果** 发热组血浆内毒素浓度明显高于健康组,其中位数分别为 8.76pg/ml 与 2.07pg/ml,差别有统计学意义($P < 0.05$)。健康受检者男组血浆内毒素浓度虽低于女组,但差别无统计学意义($P > 0.05$);不同年龄段的血浆内毒素浓度虽均有所不同,但差别亦无统计学意义($P > 0.05$);以 95% 可信区间取值,确定健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围为 0~4.14pg/ml。**结论** 血浆内毒素浓度的定量检测,可以对 FUO 患者是否存在内毒素血症做出早期判断,从而有助于其病因的快速确定,给临床治疗提供一定的帮助;厂商提供的血浆内毒素浓度参考值范

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院(余玲玲、杨锦红、刘建平);温州市龙湾区第一人民医院(王国胜);温州医学院育英儿童医院(吴秀继)

围不适合本实验室,建议不同实验室建立各自的参考值范围。

关键词 血浆内毒素 临床应用价值 动态浊度法 参考值范围

Clinical Value of Plasma Endotoxin Quantity Determination and Investigation on its Reference Range for Normal Values. Yu Lingling, Wang Guosheng, Yang Jinhong, et al. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, the First People's Hospital of Longwan, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To discuss the clinical value of plasma endotoxin quantity determination, and to establish the reference range for normal values of plasma endotoxin in Wenzhou areas. **Methods** Plasma endotoxin of 242 patients with fever of unknown origin (FUO) and 252 healthy people were detected by turbidimetric. The results were analyzed by SPSS 13.0 software. And 95% confidence interval was used to determine normal reference values. **Results** The level of plasma endotoxin in FUO group was higher than that of healthy group ($P < 0.05$). The result of female group was higher than that of male group, and the level of plasma endotoxin altered slightly among age groups. However, there were no statistical significances ($P > 0.05$). The normal value of plasma endotoxin was $0 - 4.14 \text{ pg/ml}$. **Conclusion** Detecting endotoxin in plasma will help to determine endotoxemia early and it can provide definite help for clinic diagnosis of FUO. The reference range for normal values of plasma endotoxin provided by manufacturers wasn't suit for our laboratory, and it suggested that the reference range for normal values of plasma endotoxin be established in different laboratories respectively.

Key words Plasma endotoxin; Clinical value; Turbidimetric; Reference range for normal values

细菌内毒素是革兰阴性菌(G^-)细胞壁外膜的主要结构成分,作为 G^- 菌的主要致病因子,具有多种生物效应,微量内毒素进入机体后,即可导致机体产生发热、休克及内毒素血症等临床症状^[1]。因此,测定血浆或其他体液中的内毒素浓度,在基础医药学和临床 G^- 菌感染疾病的诊疗研究中将是一项很有价值的临床指标。本研究通过对 242 例 FUO 患者和 252 例健康受检者血浆内毒素浓度的定量检测分析,初步探讨其临床应用价值,同时对温州市健康人群血浆内毒素的参考值范围进行了调查,现将结果报告如下。

资料与方法

1. 病例选择: FUO 患者(发热组)共 242 例,其中男性 107 例,女性 135 例,患者年龄 1~94 岁,平均年龄 45.4 ± 21.3 岁,均为 2009 年 7 月~2010 年 6 月期间来温州医学院附属第二医院、育英儿童医院、温州市龙湾区第一人民医院就诊,根据临床相关资料符合 FUO(即发热持续 3 周以上,体温 $\geq 38.5^\circ\text{C}$,经详细询问病史、体格检查和常规实验室检查后仍不能明确诊断者)收治入院患者^[2]。健康受检者(健康组)共 252 例,其中男性 133 例,女性 119 例,年龄 1~87 岁,平均年龄 35.5 ± 21.7 岁,均来自上述医院体检健康人群(据其体温、血常规、粪常规及生化免疫项目等指标确定无发热、无肝肾功能、肠道黏膜损害等可以引起血浆内毒素升高的因素)。

2. 材料: MB-80 微生物快速动态检测系统、T01 智能恒温仪、冰浴槽、无热原肝素钠真空采血管及 EKT-5M Set 动态内毒素检测试剂盒,均由北京金山川科技发展有限公司提供。

3. 方法: (1) 血浆制备: 内毒素一般除了游离状态外,还大量附着在血小板上。因此用含有大量血小板的血浆作为样品更为合适。此外,在分离血浆或血清时,要避免细菌的污染。

因此,本实验采用无菌及无热源肝素钠真空采血管取静脉血 2ml,进行 3000r/min 60s 分得富血小板血浆(简称 PRP)。样品离心后及时进行检验,若暂时不用,将 PRP 置 -15°C 以下冰箱中,保存时间不超过 1 周。取上述血浆(若为冷冻 PRP 需恢复至室温)0.10ml,加入装有 0.90ml 样品处理液中,混匀后置 70°C 反应 10min,取出后放入冷水浴中冷却至 37°C 以下即为待测血浆样品。(2) 测定分析: 取待测血浆样品 0.20ml 加入反应主剂中(冻干粉),溶解后使用微量加样器转移至 $10\text{mm} \times 65\text{mm}$ 无热原平底反应管中(不要产生气泡),插入 MB-80 微生物动态检测系统中进行反应,反应结束后由标准曲线自动计算出待测血浆中内毒素含量。以上操作应该严格注意避免细菌及其他微生物污染。

4. 统计学方法: 使用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学处理。本资料发热组呈偏态分布,故其集中趋势采用中位数表示,与健康组间数据比较采用两独立样本秩和检验。健康受检者血浆内毒素浓度呈近似正态分布,数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并以 95% 可信区间估计其参考值范围;两组间数据比较采用两独立样本 t 检验;多组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 发热组与健康组血浆内毒素浓度比较: 发热组血浆内毒素浓度显著高于健康组,差别有统计学意义($Z = 1.625, P < 0.05$)。发热组、健康组内毒素浓度中位数分别为 8.76 、 2.07 pg/ml 。

2. 血浆内毒素浓度与受检者性别的关系: 健康受检者男性组血浆内毒素浓度虽低于女性组,但差别无统计学意义($t = 1.625, P > 0.05$)。男性组、女性组血浆内毒素浓度分别为 $1.97 \pm 1.15 \text{ pg/ml}$ 、 $2.20 \pm$

1.08pg/ml。

3. 血浆内毒素浓度与年龄之间的关系:以 10 岁为一个年龄段将健康受检者血浆内毒素浓度进行分组统计。结果显示,不同年龄段血浆内毒素浓度虽均有所不同,但差别无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 血浆内毒素浓度与年龄的关系

组别(岁)	n	血浆内毒素浓度(pg/ml)
1~10	39	2.24 ± 1.42
11~20	41	2.27 ± 1.13
21~30	33	1.95 ± 0.93
31~40	34	2.05 ± 1.18
41~50	32	2.08 ± 1.00
51~60	31	2.07 ± 1.16
61~70	21	1.95 ± 1.12
>70	21	1.93 ± 1.01

>80 岁者只有 5 例故将其与 >70 岁组合并统计;方差分析结果 $F = 0.356, P = 0.927$;两两比较 LSD 检验结果 $P = 0.291 \sim 0.996$

4. 血浆内毒素浓度参考值范围建立:根据上述统计学分析可知血浆内毒素浓度在不同年龄、不同性别之间基本无差异,没有必要建立各自的参考值范围,故以整个人群为研究对象进行参考值范围的建立。健康受检者血浆内毒素浓度呈近似正态分布,浓度为 $2.08 \pm 1.12\text{pg/ml}$;以 95% 可信区间取值(因该项目仅过高为异常,故采用单侧界值),确定健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围为 $0 \sim 4.14\text{pg/ml}$ 。

讨 论

内毒素是 G⁻菌细胞壁结构中的脂多糖,只有在细菌死亡裂解后才释放到菌体外^[3]。内毒素具有使实验动物产生发热、影响 WBC、启动施瓦兹曼反应、激活补体和凝血系统及降低血压等毒性作用,从而造成组织损伤,并与许多临床症状密切相关^[4,5]。正常机体肠腔内含有大量细菌及内毒素,有报道称正常肠黏膜可允许少量内毒素进入门脉,而少量内毒素对促使肝脏网状内皮系统处于激活状态有一定意义,但当内毒素超过一定范围便可引起机体发生病理变化,临床主要表现为发热^[6]。在某些情况下,细菌感染可能已被控制,但内毒素仍可通过“漏”的肠黏膜,引起炎症的激活及细胞递质的释放,导致全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能不全综合征(MODS)甚至多脏器功能衰竭(MOF)等^[7]。近年来,国内外报道 G⁻菌感染有逐年增加的趋势,故快速诊断 G⁻菌所致的败血症和内毒素血症已被临床越来越重视。但现有的血培养需要花费数天时间,且由于抗菌药物的广泛

应用使培养阳性率降低,因此内毒素的测定对早期诊断病情比细菌培养更有意义,有研究结果表明内毒素血症是临床上有用指标,预测 G⁻菌败血症的阳性预测值为 48%,而没有内毒素血症就可以基本排除发生败血症的可能,阴性预测值为 99%^[8]。本研究结果表明,发热组的血浆内毒素浓度明显高于健康组($P < 0.05$),这充分说明了 FUO 患者体内存在内毒素血症的可能性。由于内毒素定量检测 2h 即可以报告结果,不需要等待漫长的细菌培养结果,故我们认为通过血浆内毒素浓度的定量检测,可以初步对 FUO 患者是否存在内毒素血症做出早期判断,以便临床有针对性地进一步检查,从而尽快地确定 FUO 的病因,给临床治疗提供一定的帮助。

目前较常用的血浆内毒素的检测技术多基于鲎试验(limulus amebocyte lysate test, LAL)测定方法之上。LAL 是由于鲎(一种海洋生物)血淋巴液中有一种多功能的白色变形细胞,其表面含有活性颗粒,当它遇到微量细菌内毒素,颗粒就会脱落,细胞裂解而形成凝胶的凝固物,通过检测凝胶的形成来检测内毒素。其检测方法主要有:比色法、浊度法、凝胶法、酶联免疫吸附法、流式细胞术等(本实验室所采用的是目前广泛应用的鲎试验动态浊度法)^[9~11]。各检测技术由于前处理的方法与测定原理不同及人群地域的差异,其结果亦存在着一定的差异,且大多数实验室内毒素检测的参考值范围多由仪器厂商提供或是以国外人群为研究对象测得的数据。为此我们对动态浊法定量检测温州健康人群血浆内毒素浓度参考值范围进行了调查,以便其在临床中更好地应用。

本研究结果显示:252 例健康受检者血浆内毒素浓度的结果为 $2.08 \pm 1.12\text{pg/ml}$,低于文献报道,可能是由于人群地域的差异所引起^[12];而明显高于王占科等^[13]报道($0.108 \pm 0.065\text{pg/ml}$,采用 rFC 基质显色法),这可能与检测方法不一致有关。男性、女性组及不同年龄段的血浆内毒素浓度虽均有所不同,但差别均无统计学意义($P > 0.05$),由此可见血浆内毒素浓度在不同年龄、不同性别之间基本无差异,没有必要建立各自的参考值范围,故我们认为整个人群可以共用一个参考值。由于血浆内毒素浓度仅过高为异常,故在以 95% 可信区间估计其参考值范围时,采用单侧界值,确定健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围为 $0 \sim 4.14\text{pg/ml}$ 。此结果明显低于仪器厂商(北京金山川科技发展有限公司)提供的参考值范围($< 10.00\text{pg/ml}$),可能与厂商采用的数据来源于国

外文献报道的结果有关,其研究的群体本身就有所差异而致。因此,我们认为不同人群血浆内毒素浓度可能存在一定的差异,厂商提供的血浆内毒素参考值范围并不适合本实验室,建议不同实验室建立各自的参考值范围。

参考文献

- 1 Trent MS, Stead CM, Tran AX, *et al.* Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis [J]. J Endotoxin Res, 2006, 12(4): 205 – 223
- 2 盛瑞媛. 全国发热性疾病学术研究会纪要[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(5): 784 – 785
- 3 马全玲, 刘扬, 李传保. 内毒素检测与临床应用现状[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(2): 64 – 65
- 4 Tweedie D, Milman A, Holloway HW. *et al.* Apoptotic and behavioral sequelae of mild brain trauma in mice[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(4): 805 – 815
- 5 Jiang W, Hu M, Rao J, *et al.* Over – expression of toll – like receptors and their ligands in small – for – size graft[J]. Hepatol Res. 2010, 40(3): 318 – 329
- 6 Gregory M, Edwin A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial

- translocation and permeability changes [J]. World J Surg, 1996, 20: 411 – 417
- 7 John P. Nutritional support in critically ill patients [J]. Ann Surg, 1994, 220: 610 – 616
- 8 Sander JH, Harry R, Jan W, *et al.* Endotoxemia: an early predictor of septicemia in febrile patients [J]. Lancet, 1988, 86: 605 – 609
- 9 汪玲, 王桂平. 细菌内毒素的检测方法及其应用概况 [J]. 中国药师, 2003, 5: 316 – 317
- 10 Hartung T, Fennrich S, Fischer M, *et al.* Development and evaluation of pyroge test based on human whole blood [J]. AL, TEX, 1998, 15(5): 9 – 10
- 11 Takeshita S, Nakatani K, Tsujimoto H, *et al.* Detection of circulating lipopolysaccharide – bound monocytes in children with Gram – negative sepsis [J]. J Infect Dis, 2000, 182(5): 1549 – 1552
- 12 徐修礼, 张建芳, 樊新. 革兰阴性菌感染患者血浆内毒素测定的临床意义 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(3): 351 – 353
- 13 王占科, 冯青青, 杨莉萍. 发热患者血浆内毒素定量测定与血培养结果比较 [J]. 江西医学检验, 2004, 22(1): 29 – 31

(收稿: 2011 – 01 – 29)

(修回: 2011 – 04 – 07)

抑制 11 β – HSD₂ 对 GC 保护血管内皮细胞炎性损伤的影响

王兴友 王丽娜 陈晓琳 陈杭薇

摘 要 **目的** 探讨阻断 11 β – HSD₂ 的表达对 GC 保护血管内皮炎性损伤中的影响。**方法** 用甘草次酸(GA)抑制人脐静脉内皮细胞 11 β – HSD₂ 的表达, 观察 GA 作用后体外培养的人脐静脉内皮细胞在 LPS 和(或)Dex 刺激下 IL – 6 等炎性细胞因子的分泌及发生凋亡的变化, 同时观察不同浓度的 GA 对人脐静脉内皮细胞 11 β – HSD₂ 的表达的抑制情况。**结果** GA 单独作用于人脐静脉内皮细胞时, 对 11 β – HSD₂ mRNA 的表达无明显影响。但 GA 在 HUVEC 受到 LPS 刺激时能够明显抑制 LPS 诱导的 11 β – HSD₂ mRNA 的表达。此外 GA 与 GC 合用可进一步增强对 11 β – HSD₂ mRNA 的表达的抑制, GA 能显著抑制 LPS 诱导的 HUVEC 分泌 IL – 6 和 sICAM – 1, 同时显著降低 LPS 诱导的 HUVEC 的细胞凋亡率。**结论** 11 β – HSD 是 GC 作用的受体前调节的关键物质, GA 又是传统的 11 β – HSD 抑制剂, 因此 11 β – HSD₂ 完全可以作为 GA 抗炎等作用的 1 个靶点。GA 通过抑制 11 – HSD₂ mRNA 的表达是其增强 GC(Dex)抗炎作用的一个主要机制。GA 与 GC 合用可进一步增强对 11 β – HSD₂ mRNA 的表达的抑制, 同时加强了 GC 对 LPS 诱导的血管内皮炎性损伤的保护作用。表明 GA 与 GC 合用能够通过受体前调节机制加强抗炎效应, 是一个值得关注的途径。

关键词 11 β 羟基类固醇脱氢酶 2 糖皮质激素 糖皮质激素受体 血管内皮细胞 甘草次酸

Effect of GC for Protection of the Inflammatory Injury in HUVEC by Inhibiting the Expression of 11 β – HSD₂. Wang Xingyou, Wang Lina, Chen Xiaolin, Chen Hangwei. Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China

Abstract Objective To explore the effect of GC for protection of the inflammatory injury in HUVEC by inhibiting the expression of

基金项目: “十一五”军队科技攻关项目资助(08G006)

作者单位: 100700 北京军区总医院呼吸内科