文章编号:1000-5404(2008)06-0525-05

论著

人 NT-proBNP 的高效原核表达及免疫学检测标准品的研究

易维京,李 鹏,李淑慧,智 强,胡川闽 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 构建人 NT-proBNP(氨基末端脑钠肽,amino-terminal pro-brain natriuretic peptide)的高效原核表达载体,建立重组 NT-proBNP 纯化工艺,制备 NT-proBNP 免疫学检测工作标准品。**方法** 采用人工合成和套叠(GeneSOEing)PCR 技术相结合的方式对 NT-proBNP 基因序列进行密码子进行偏嗜性改造后克隆入原核表达质粒 pET32a 和 pET42a 构建不同形式的 NT-proBNP 原核表达重组质粒;采用离子交换、HIS 和 GST 亲和层析柱以及肠激酶(EK 酶)酶切等方法建立 NT-proBNP 重组蛋白的纯化工艺;用 Roche 公司 NT-proBNP 检测试剂盒测定所制备的标准品的免疫活性和稳定性。**结果** pET32a 和 pET42a 构建的不同形式 NT-proBNP 原核表达质粒在 BL21(DE3)均实现了高效可溶性表达,通过多种纯化方案制备了纯度达 98.3% 的 NT-proBNP-83 重组蛋白,经测定具有良好免疫活性和稳定性,适合用于免疫学检测工作标准品。**结论** 成功构建了人 NT-proBN 的高效原核表达载体,筛选出较适合用于免疫学检测工作标准品的 NT-proBNP 重组蛋白。

关键词: NT-proBNP 高效;套叠 PCR 肠激酶;蛋白纯化;工作标准品
中图法分类号: R341;R392-33;R392.2 **文献标识码:** A

Construction and preparation of prokaryotic high-level expression vector of human NT-proBNP

YI Wei-jing, LI Peng, LI Shu-hui, ZHI Qiang, HU Chuan-min (Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic high-level expression system for human NT-proBNP (amino-terminal pro-brain natriuretic peptide) and establish the working standard for immunoassay. Methods According to the frequency of *E. coli* codons, an *E. coli* favorite DNA fragment, encoding amino acids sequence identical to that of the wild type NT-proBNP was cloned into plasmid pET32a and pET42a by synthesized oligoes and GeneSOEing PCR techniques. The NT-proBNP protein was isolated by cation exchange, his-tag affinity column, GST affinity chromatograph and digested by enterokinase. Immunoreactivity and stability of the protein were identified by using NT-proBNP test kit (Roche. Ltd). Results After induced by IPTG, the NT-proBNP was expressed efficiently as soluble protein in *E. coli* cells. The purified NT-proBNP (98.3%) was immunoreactive and stable. Conclusion The prokaryotic high-level expression vector of human NT-proBNP was successfully constructed. A recombinant protein NT-proBNP suitable for standards of immunodetection was obtained.

Key words: NT-proBNP; GeneSOEing PCR; protein purification; standards

氨基末端脑钠肽(amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)是心肌细胞中的脑钠肽原(pro-brain natriuretic peptide, proBNP)在成熟过程中切除下的含有 76 个氨基酸残基的无生物活性片段,相对分子质量为 8.6×10^3[1]。目前研究证实,B 型钠尿肽(BNP)或非活性的 N 末端前钠尿肽(NT-ProBNP)是心衰时较好的心源性标志物[2],能反映心室容积扩大、心室超负荷和心脏功能有无损伤及损伤程度。NT-proBNP 和含有 C 端 32 个氨基酸残基的具有生物活性的 BNP 是等摩尔释放,因此二者在心血管系统疾病的诊断、治疗监测和预后方面有着相似的临床应用。但与 BNP 相比,NT-proBNP 因其半衰期长(半衰期为120 min)、心衰时升高幅度大而更有利于临床应用[2-4]。

定量检测人 NT-proBNP 常用的是免疫学方法,建立免疫学定量检测方法除了需要特异性良好的抗体之

作者简介:易维京,男,江西省宜春市人,硕士研究生,技师,主要从事新型检测技术方面的研究。电话:13220359232,E-mail:yiweijing149@163.com
通信作者:胡川闽,电话:(023)68753761,E-mail:chuminhu@163.com
收稿日期:2007-11-06;修回日期:2008-01-21

外,还需要相应的检测标准品与之配套。对检测标准品要求主要为:与天然存在的人 NT-proBNP 有相同或相近的结构,具有相同的免疫原性及高度的稳定性。人体内 NT-proBNP 极低[5],正常外周血浓度为 100 pg/ml 左右;因而无法从血浆(血清)中纯化。本研究尝试采用基因工程方法,原核表达 NT-proBNP,并制备较适合用于免疫学检测工作标准品的 NT-proBNP 重组蛋白形式,为下一步研究开发 NT-proBNP 检测试剂盒奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒 所用菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、DH5α 为本实验室保存;pGEM-T 购自 promega 公司;pET32a(+)及 pET42a(+)购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ购自 ToYoBo 公司;pfu DNA 聚合酶、T_4DNA 连接酶购自 promega 公司;DL2000 DNA Marker,DNA 胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自 Tiangen 生物科技有限公司;NT-proBNP 检测试剂盒购自 Roche 公司;蛋白质 BCA 法定量检测试剂购自 PIERCE 公司;蛋白质 marker 为中科院生物制品研究所产品;纯化所用层析柱及填料购自 Amersham 公司;肠激酶(EK 酶)为本室自制(带 his-tag)。引物合成及测序均由 Invitrogen 公司完成。其他试剂均为国产化学分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NT-proBNP 基因序列的构建 将人 NT-proBNP 基因中密码子在 *E. coli* BL21 使用率 < 10% 的同义置换为 *E. coli* BL21 偏爱的密码子。采用套叠 PCR,根据其原理将改造的基因分成碱基数为 40 左右的序列分别合成,每一片段与前后序列均有部分重叠,这样片段间可以互为引物和模板最终得到全长基因(表 1)。同时根据改造后基因序列设计两条 N 端引物 S1 和 S2,一条 C 端引物 A1,N 端引物加入 *Bam*H Ⅰ酶切位点,C 端引物加入 *Sal* Ⅰ酶切位点,S2 酶切位点后加入 GATGATGATGATAAG 序列,其编码 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列为 EK 酶的识别位点。

表 1 拼接序列及引物合成

引物序列名称	引物序列
Seq1:	5′-CACCCGCTGGGCAGCCCGGGTAGCGCCAGCGACCTGGAAACG-3′
Seq2:	5′-CTGCTCCTGCAGGCCGCTCGTTTCCAGGTCGCTGGCGCTA-3′
Seq3:	5′-AGCGGCCTGCAGGAGCAGCGCAACCATCTGCAGGGCAAACTG-3′
Seq4:	5′-CCACCTGCAGCTCGCTCAGTTTGCCCTGCAGATGGTTGCG-3′
Seq5:	5′-AGCGAGCTGCAGGTGGAGCAGACCAGCCTGGAGCCGCTGC-3′
Seq6:	5′-ACCGGTCGGACGCGGGCTCTCCTGCAGCGGCTCCAGGCTGGTCTGCT-3′
Seq7:	5′-AGGAGAGCCCGCGTCCGACCGGTGTCTGGAAGAGCCGCGAGGTGG-3′
Seq8:	5′-TGGCCACGGATGCCCTCGGTGGCCACCTCGCGGCTCTTCCAGAC-3′
Seq9:	5′-CCACCGAGGGCATCCGTGGCCACCGCAAAATGGTCCTGTACACCCTGC-3′
Seq10:	5′-TTAGCGCGGTGCGCGCAGGGTGTACAGGACCATTTTGCGG-3′
S1	5′-CGCGGATCCCACCCGCTGGG-3′
S2	5′-GGATCCGATGATGATGATAAGCACCCGCTGGG-3′
A1	5′-AGGCGTCGACTTAGCGCGGTGC-3′

取合成的寡核苷酸片段各 100 pmol,按袁盛凌等[8]介绍的套叠 PCR 技术用 pfu 酶扩增大肠杆菌偏爱氨基酸密码子的 NT-proBNP 基因,将获得的 PCR 产物纯化后加“A”尾后连至 pGEM-T 载体中,转化 DH5α 感受态中,用 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切的方法鉴定重组质粒,阳性重组质粒再进行测序测定。

1.2.2 NT-proBNP 原核重组表达质粒的构建,表达和鉴定

测序验证含有不同 5′端修饰的 pGEM-T-NT-proBNP 质粒经 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切下后分别与 pET32a 及 pET42a 连接,按常规 IPTG 诱导表达,6 000 r/min 离心 3min 收集菌体,用超声破菌仪裂解菌体并高速离心分离细菌上清和沉淀,15% SDS-PAGE 电泳鉴定其可溶性情况。

1.2.3 NT-proBNP 重组蛋白的纯化与酶切 pET32a-NT-proBNP 表达的蛋白是以 Tioredoxin-NT- proBNP(Trx-NT-proBNP)形式存在,除了 Thioredoxin 标签之外还有 His 标签,计算等电点为 8.2 左右,根据以上信息设计用阳离子层析柱 HiTrap SP. F. F 初纯化和 HisTrap HP 再次纯化的的纯化方案。pET42a-NT-proBNP 表达的蛋白是以 GST-NT-proBNP 形式存在,除了 GST 标签之外也有 His 标签,其纯化方案采用 GSTrap F. F. 和 HisTrap HP 双亲和柱进行纯化。将获得的纯化重组蛋白用 HiTrap Desalting 置换缓冲体系为 EK 切割 buffer (50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0),按 EK 酶与蛋白 1∶1 000 的质量比加入 EK 酶,4 ℃低速摇床(60 r/min)切割 12 h 左右。切割后用 His- Binding buffer 稀释后 HisTrap HP 纯化,分别收集穿透、10% B 和 100% B 的蛋白,17.5% SDS-PAGE 电泳进行鉴定。

1.2.4 NT-proBNP 重组蛋白浓度,纯度及特异免疫反应性鉴定 用 BCA 法进行蛋白定量测定,纯度采用 HPLC 测定。采用 Roche 公司 NT-proBNP 检测试剂盒测定其特异免疫反应性:稀释成合适的浓度后,将稀释后的蛋白 1 μl 加入到 299 μl 的人血清中,分别测定人血清和加了重组蛋白的人血清中 NT-proBNP 含量。通过计算加入的重组蛋白中 NT-proBNP 含量与实际测定中使血清 NT-proBNP 增加的含量的比值反映 NT-proBNP 检测试剂盒对重组蛋白中 NT-proBNP 特异免疫反应性的检出效果。

1.2.5 NT-proBNP 重组蛋白稳定性试验 将纯化的 NT-proBNP 重组蛋白用保存液(含 BSA、aprotinin、EDTA 和庆大霉素)稀释后等份分装,各种蛋白初始浓度相近。置于 4 ℃保存,分别于 1、3、7、9、11、15 d 后用 NT-proBNP 电化学发光免疫测定试剂测定,计算免疫活性比率。

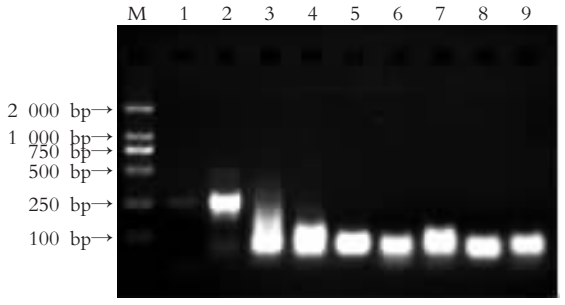
2 结果

2.1 NT-proBNP 基因序列的构建

通过生物信息学分析发现编码 NT-proBNP 蛋白的基因中第 41、54、69、73、76 位氨基酸密码子在大肠杆菌中使用频率 < 10%,对其进行同义改造后分段合成。按袁盛凌等[8]介绍的套叠 PCR 技术经三轮 PCR 后,以第三轮 PCR 反应产物为模板,分别以 S1、S2 和 A1 为引物进行 PCR,经琼脂糖电泳在 250 bp 处有一产物条带,其大小与设计基因大小相同,结果见图 1。

由于 pfu DNA 聚合酶不能在 PCR 产物的 3′端加入非模板序列的 A,这样的 PCR 产物不可直接与带有 T 突出端的 TA 克隆连接,构建成 TA 重组质粒,根据 promegap GEM-T 载体提供的方法加“A”尾后连至 pGEM-T 载体中,转化 DH5α 感受态中,提取阳性克隆质粒用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切的方法鉴定。经

DNA 序列测序分析，阳性 TA 重组质粒经 DNA 测序获得了与设计序列完全一致的克隆。

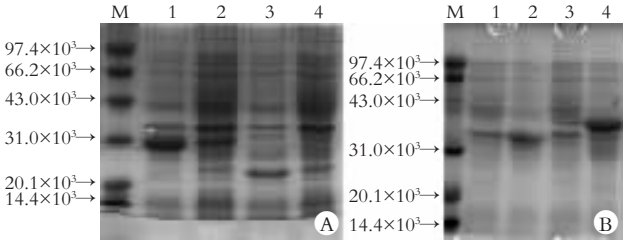


M：标准；1：以 S1 和 A1 为引物的 PCR 产物；2：以 S2 和 A1 为引物的 PCR 产物；3：第三轮 PCR 产物；4：第二轮 PCR 产物；5～9：第一轮 PCR 的产物

图 1　NT-proBNP GeneSOEing PCR 产物电泳图

2.2　NT-proBNP 原核重组表达质粒的构建、表达和鉴定

经测序验证的 pGEM-T-NT-proBNP 质粒经 *Bam*HⅠ和*Sal*Ⅰ双酶切后分别表达载体 pET32a（含引物 S1 的 PCR 产物）及 pET42a（含引物 S2 的 PCR 产物）连接，连接产物转化入 DH5α 菌质粒扩增，提取质粒用 *Bam*HⅠ、*Sal*Ⅰ双酶切的方法鉴定重组质粒，再将构建成功的质粒转化入表达宿主 BL21（DE3），经 1.0 mmol/L IPTG 37 ℃诱导表达 5 h。电泳结果（图 2）表明 pET32a-NT-proBNP 和 pET42a-NT-proBNP 均在 BL21 中表达融合蛋白，相对分子质量分别为 30×10^3 和 40×10^3 左右，表达量占菌体总蛋白的 30 % 以上。经鉴定表达蛋白破菌后几乎都存在上清中，为可溶性表达。



A：pET32a-NT-proBNP 诱导；B：pET42a-NT-proBNP 诱导；M：标准；1：NT-proBNP 重组质粒诱导；2：NT-proBNP 重组质粒未诱导；3：空质粒诱导；4：空质粒未诱导

图 2　NT-proBNP 诱导表达

2.3　NT-proBNP 重组蛋白的纯化与酶切

Trx-NT-proBNP 经阳离子层析柱 HiTrap SP. F. F 初纯化和 HisTrap HP 再次纯化的方法得到了纯度 98% 的融合蛋白。GST-NT-proBNP 经 GSTrap F. F. 和 HisTrap HP 双亲和柱纯化即可得到纯度为 90% 的 GST-NT-proBNP 融合蛋白。

将纯化重组蛋白用 HiTrap Desalting 置换缓冲体系为 EK 酶切割 buffer，加入 EK 酶进行酶切，切割后用 HisTrap HP 纯化。pET32a-NT-proBNP 切下的蛋白除 76 个氨基酸残基的 NT-proBNP 外在其 N 端带有 7 个质粒氨基酸残基（Ala-Met-Ala-Asp- Ile-Gly-Ser），共 83 个氨基酸残基，大小为 9.5×10^3（记为 NT-proBNP-83）。在纯化过程中我们发现它会以非特异的形式结合到 HisTrap HP 层析柱，在 10% B 的条件被洗脱（图 3），由于 Trx-NT-proBNP 蛋白纯化时已经用 10% B 去除了非特异结合的杂蛋白，故洗脱的 NT-proBNP-83 纯度达 98. 3%。SDS-PAGE 电泳结果（图 4）。GST-NT-proBNP 中的 EK 酶识别位点为我们在基因设计时引入的，切下的蛋白与天然 NT-proBNP 完全一样的 76 个氨基酸（记为 NT-proBNP-76），纯化过程中切下的蛋白主要存在穿透液中。SDS-PAGE 电泳图（图 5）。

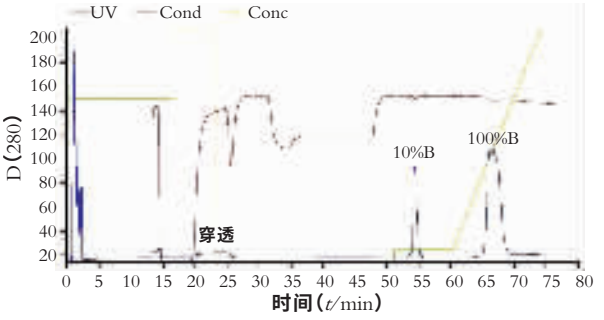
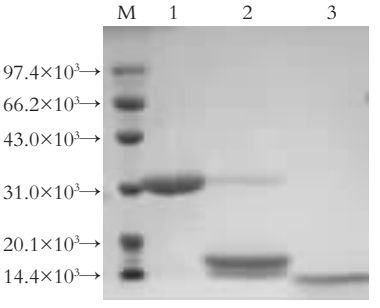
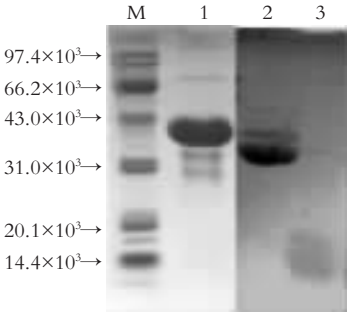


图 3　Trx-NT-proBNP 切割后 HisTrap HP 纯化



M：标准；1：Trx-NT-proBNP 未切割；2：Trx-NT-proBNP 切的标签；3：NT-proBNP-83

图 4　Tioredoxin-NT-proBNP 的纯化与切割



M：标准；1：GST-NT-proBNP 未切割；2：GST-NT-proBNP 切下的标签；3：NT-proBNP-76

图 5　GST-NT-proBNP 的纯化与切割

2.4　NT-proBNP 重组蛋白浓度，纯度及特异免疫反应性鉴定

用 BCA 法进行蛋白定量测定，纯度采用 HPLC 测定。Trx-NT-proBNP 经 HPLC 检测纯度为 98%，每升诱导菌获得 28. 4 mg 该融合蛋白，经切割后可以获得 7 mg 左右的 NT-proBNP-83。GST-NT-proBNP 经 HPLC 检测纯度为 90%，每升诱导菌获得 38. 5 mg 融合蛋白，经切割后可以获得 3. 5 mg 左右的 NT-proBNP-76。经 Roche 电化学发光免疫测定试剂测定其特异免疫反应性，结果见表 2。制备的 4 种 NT-proBNP 重组蛋白均具有较强的特异免疫反应活性，但切下的 NT-proBNP-76 和 NT-proBNP-83 免疫反应活性明显优于带有标签的 NT-proBNP 蛋白，原因可能为大分子量标签对 NT-proBNP 特异免疫反应活性

的影响,而 NT-proBNP-76 可能由于存在降解的小片断使蛋白定量结果偏低。

表 2 电化学发光免疫测定试剂测定重组 NT-proBNP 特异免疫反应性(浓度单位:pg/ml)

测定样品	测定浓度	增加浓度	理论增加浓度	增加浓度/理论增加浓度
人血清 + PBS	3 122	0	0	0
人血清 + Trx-NT-proBNP	8 648	5 526	7 325	75%
人血清 + GST-NT-proBNP	9 754	6 632	9 605	69%
人血清 + NT-proBNP-83	28 645	25 523	27 050	94%
人血清 + NT-proBNP-76	15 467	12 345	10 800	114%

增加浓度 = 测定浓度 - 人血清测定浓度;理论增加浓度 = (融合蛋白相对分子质量/ NT-proBNP 相对分子质量) × 蛋白纯度 × 蛋白浓度。

2.5 NT-proBNP 重组蛋白稳定性试验

测定结果见表 3,Trx-NT-proBNP 在 4 ℃保存 15 d 活性下降为 7.8%;NT-proBNP-83 下降了 13.2%;而 NT-proBNP-76 下降了 47.0%, Trx-NT-proBNP 和 NT-proBNP-83 的稳定性明显优于 NT-proBNP-76。

表 3 NT-proBNP 重组蛋白稳定性试验(pg/ml)

测定样品	1 d	3 d	7 d	9 d	11 d	15 d
保存液	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Trx-NT-proBNP	9 935	9 886	9 703	9 450	9333	9158
NT-proBNP-83	12 432	12 366	12 309	11 792	11 589	10 795
NT-proBNP-76	8 892	7 663	6 946	6 402	5 623	4 709

3 讨论

研究表明,血 NT-proBNP 对左心室功能不全的评价、心衰及急性冠脉综合征的危险分层很有价值,国外大规模临床实验研究结果表明 NT-proBNP 是一项反映心脏损伤的金指标[6,7]。目前 NT-proBNP 的诊断试剂仅有国外几家大型医疗企业生产,价格昂贵,普及推广较难。建立 NT-proBNP 免疫学定量检测方法除了需要特异性良好的抗体外,还需要相应的检测标准品与之配套。由于正常血清中 NT-proBNP 含量极低且不均一,无法从血中直接纯化获得,而直接多肽合成成本过高。用基因工程制备低分子量多肽,一般采用融合蛋白表达,能克服单独表达低分子量多肽时出现的翻译效率低表达产物易受蛋白水解酶降解的缺陷,并且均可以通过插入某些特定序列(如 His-tag)从而简化表达产物的纯化方法。此外,某些载体蛋白具有增加目标多肽的溶解度,促进其折叠形成活性构象的功能。

GeneSOEing 技术具有可以随意对目的基因实行密码子的选择和改造及基因序列进行裁剪等其他操作,对于设计构建多个基因的融合基因也十分方便,并且在 PCR 过程中不受模板限制,对 PCR 过程中 cDNA 模板结构、数量、温度及离子强度等条件无要求,PCR 条件具有一定通用性。但其亦有 2 个缺点:一是合成引物的花费大;二是 PCR 的随机错误。但相对于全基因合成来说,其成本就低的多了,我们原先考虑是直接全基因合成,但送公司分析显示基因内部结构复杂,GC 含量过高,结果得不到保证。对于 PCR 的随机错误我们在测序时也存在,主要是单碱基的缺失突变[8],我们认为与 pfu 等高保真酶 3′-5′的酶切活性相关,故我们认为在 PCR 操作时特别在拼接加样时低温下操作,减少突变。此外,在拼接 PCR 过程有不同策略,我们采用的核心模板法(core template)是 Di-Donato 等[9]提出的,成功的机会较高。

融合蛋白的纯化一般先采用离子交换或疏水层析初纯化或两种亲和层析柱可以达到很好的纯化效果,我们选用的 pET32a 和 pET42a 即是表达多种标签蛋白的载体。在重组质粒内引入 EK 酶识别序列,然后用 EK 酶对表达产物进行酶切是制备与野生型完全一致的氨基酸序列的重组蛋白的常见方法。我们使用的 EK 酶为实验室重组制备带有 His 标签,节约了成本,同时在最后一步和切下的标签一块去除,不需额外的纯化步骤除去加入的 EK 酶。

Apple 等[10]代表 IFCC 心脏标志物专家组关于 B 型钠尿肽测定的质量要求。最初,我们拟采用在 pET42a 引入 EK 酶识别序列制备 NT-proBNP-76 作为标准品,但在制备过程发现其容易降解变的大小不一,而本来用于抗体制备的 Trx-NT-proBNP 切下的 NT-proBNP-83 却稳定性良好,17.5% SDS-PAGE 电泳显示其均一性很好。通过进一步用电化学发光测定其免疫反应活性和稳定性,我们认为 NT-proBNP-83 与 NT-proBNP-76 相近的结构和相同的免疫反应活性和更好的稳定性,故更适合作为 NT-proBNP 免疫学检测工作标准品。本研究为建立免疫学定量检测 NT-proBNP 方法奠定了重要的工作基础。

参考文献:

[1] Hunt P J, Yandle T G, Nicholls M G, *et al*. The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (Pro-BNP) circulates in human plasma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214 (3): 1175 - 1173.

[2] Schou M, Gustafsson F, Corell P, *et al*. The relationship between N-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk for hospitalization and mortality is curvilinear in patients with chronic heart failure[J]. Am Heart J, 2007, 154(1): 123 - 129.

[3] Fonseca C, Sarmento P M, Minez A, *et al*. Comparative value of BNP and NT-proBNP in diagnosis of heart failure[J]. Rev Port Cardiol, 2004, 23(7 - 8): 979 - 991.

[4] Doust J A, Pietrzak E, Dobson A, *et al*. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart

failure: systematic review[J]. BMJ, 2005, 330(7492):625.
[5] Richards A M, Nicholls M G, Yandle T G, *et al*. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction[J]. Circulation, 1998, 97(19): 1921 - 1929.
[6] Dolci A, Panteghini M. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more[J]. Clin Chim Acta, 2006, 369 (2): 179 - 187.
[7] Galema T W, Yap S C, Geleijnse M L, *et al*. Early Detection of Left Ventricular Dysfunction by Doppler Tissue Imaging and N-terminal Pro-B-type Natriuretic Peptide in Patients with Symptomatic Severe Aortic Stenosis[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2007, Jul 10 [Epub ahead of print]
[8] 袁盛凌, 段海清, 张兆山. 蛇毒类凝血酶 Calobin cDNA 的设计合成与克隆[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(5): 357 - 360.
[9] Di-Donato A, de-Nigris M, Russo N, *et al*. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction[J]. Anal Biochem, 1993, 212(1): 291 - 293.
[10] Apple F S, Panteghini M, Ravkilde J, *et al*. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays[J]. Clin Chem, 2005, 51(3): 486 - 493.

(编辑　郭建秀)

文章编号:1000-5404(2008)06-0529-01

个案与短篇

石菖蒲挥发油对吗啡戒断大鼠微循环障碍的治疗作用

刘秀平,董　超,廉海晨,王亚龙,李　娜　(河北大学医学部实验中心,河北 保定 071000)

石菖蒲挥发油中含有 β-细辛醚、α-细辛醚等多种有效成分。本室自发现石菖蒲挥发油对吗啡依赖大鼠戒断症状有明显的抑制作用后[1],又观察了石菖蒲挥发油对吗啡戒断大鼠肠系膜微循环障碍的影响,并与 654-2(山莨菪碱)的作用相比较,为临床脱毒治疗药物筛选提供依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

选用体质量为 220 ~ 270 g 的清洁级、健康雄性 SD 大鼠,由河北省实验动物中心提供。动物合格证编号:605125

1.2　药品与试剂

盐酸吗啡注射液,沈阳制药厂出品,批号:060303; 纳络酮,北京四环医药科技有限公司生产,批号:0512201; 654-2(山莨菪碱),泗水希尔康制药有限公司生产,批号:0601222。石菖蒲生药,河北省安国市光明饮片加工厂出品,生产批号:040417。

1.3　石菖蒲挥发油提取及其乳液制备

取石菖蒲生药,加 10 倍量水按水蒸气蒸馏法提取,收集挥发油,重蒸馏 2 次,加 3% 吐温-80 制成 1∶1(即每毫升乳液含1 g 生药)挥发油乳液。

1.4　方法

取 40 只大鼠随机分成 4 组,每组 10 只。分别为正常对照组(正常饲养 3 d)、吗啡戒断组、654-2 治疗组、石菖蒲治疗组。给吗啡戒断组、654-2 治疗组、石菖蒲治疗组大鼠连续递增皮下注射吗啡,第 1 ~ 6 天递增注射剂量分别为 5、10、15、20、30、50 mg/kg,每天 3 次, 6 d 后大鼠即可产生吗啡依赖,于第 7 天停药,并在早晨 7:20 用石菖蒲挥发油(5 g/kg) 给第 4 组大鼠灌胃,7:40 给第 3 组大鼠腹腔注射 654-2(10 mg/kg),8:00 给 2 ~ 4 组大鼠腹腔注射纳络酮(0.5 mg/kg)催瘾戒断, 给第 1 组大鼠腹腔注射与纳络酮等量生理盐水,10 min 后给 4 组大鼠腹腔注射 25% 的乌拉坦(1 g/kg)麻醉,腹正中切开 1 ~ 2 cm,取回盲部附近小肠系膜平铺于有机玻璃灌流小池中固定,采用 BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟电子有限公司生产)主要测量微动、静脉直径,血流速度和毛细血管血液渗出情况(观察 10 个视野中的血液渗出数量)。

1.5　统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,进行方差分析和 *SNK-q* 检验。

2　结果

与正常对照组比较,吗啡戒断组大鼠肠系膜微动、静脉口径变小,血流速度减慢,毛细血管血液渗出明显。与吗啡戒断组比较,654-2 治疗组大鼠微动、静脉口径增大、血流速度加快,毛细血管血液渗出减少($P < 0.05$);而石菖蒲治疗组大鼠微动、静脉口径、血流速度均有明显改善, 毛细血管血液渗出明显减少;石菖蒲治疗组大鼠微动、静脉口径、血流速度与 654-2 组比较无明显差异($P > 0.05$),毛细血管渗出明显减少(表 1)。

表 1　石菖蒲挥发油与 654-2 对吗啡戒断大鼠微循环障碍的治疗作用 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	微动脉流速(μm/s)	微动脉直径(μm)	微静脉直径(μm)	血液渗出(个/视野)
正常对照组	89.5 ± 4.7	25.2 ± 3.2	32.3 ± 3.4	0.8 ± 0.1
吗啡戒断组	60.2 ± 15.8[a]	17.8 ± 1.6[a]	21.7 ± 1.3[a]	4.9 ± 0.5[b]
654-2 治疗组	82.9 ± 16.3[c]	23.2 ± 2.2[c]	27.6 ± 4.3[c]	2.9 ± 0.4[c]
石菖蒲治疗组	78.8 ± 14.4[c]	21.2 ± 2.1[c]	26.1 ± 2.2[c]	0.7 ± 0.3[df]

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与正常对照组比较; c: $P < 0.05$; d: $P < 0.01$,与吗啡戒断组比较; e: $P < 0.05$; f: $P < 0.01$,与 654-2 治疗组比较

作者简介:刘秀平,女,河北省唐山市人,硕士,副教授,主要从事戒毒方面的研究, 电话:(0312)5075630 ,E-mail: lxp5630@126.com

收稿日期:2007-10-12;修回日期:2008-01-26

(下转 532 页)