文章编号:1000-5404(2009)14-1345-04

论著

重组人睫状神经因子聚乙二醇化条件的优化

王 彦[1],范 开[2],夏永鹏[3],张继兰[2],李秀梅[4],邱宗荫[1] ([1]重庆医科大学药学院,重庆 400042;[2]重庆理工大学化学与生物工程学院制药工程系,重庆 400050;[3]重庆市卫生局,重庆 400042;[4]重庆市药品检验所生化与生物制品室,重庆 401121)

摘 要:目的 对单甲氧基聚乙二醇丁醛(mPEG-ButyrALD,相对分子质量 20×10^3)修饰重组人睫状神经因子(rh-CNTF)的条件进行优化。**方法** 优化了pH值、温度、时间、rh-CNTF与PEG的修饰比例、rh-CNTF浓度等修饰条件,并对修饰产物行分离纯化。鸡胚背根节培养法检测和比较rh-CNTF和PEG-rhCNTF的体外生物学活性。**结果** rh-CNTF与PEG的修饰比例、rh-CNTF的浓度和pH值是主要影响因素,最佳pH为6.5,最佳rh-CNTF浓度为1~2 mg/ml,rh-CNTF与PEG的最佳质量比为1:1,时间和温度影响甚微。rh-CNTF的体外神经营养活性约为PEG-rhCNTF的2倍。**结论** 本法优化了修饰重组人睫状神经因子的条件。

关键词: 聚乙二醇修饰;重组人睫状神经因子;优化
中图法分类号: R914;R966;R977.6 **文献标识码:** A

Condition optimization for modification of recombinant human ciliary neurotrophic factor with polythylene glycol

WANG Yan[1], FAN Kai[2], XIA Yong-peng[3], ZHANG Ji-lan[2], LI Xiu-mei[4], QIU Zong-yin[1] ([1]School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400042; [2]Faculty of Pharmaceutical Engineering, College of Chemical and Biotechnology Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050; [3]Chongqing Manicipal Health Bureau, Chongqing 400042; [4]Department of Biochemistry and Biologital products, Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, Chongqing)

Abstract: Objective To optimize the modification condition of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rh-CNTF) with mPEG-ButyrALD (relative molecular weight 20×10^3). Methods Different pH values, temperatures, times and the mass ratio of rh-CNTF and PEG, the concentration of rh-CNTF was used to obtain better rh-CNTF PEGylation. And then the modified rh-CNTF was separated and purified. The *in vitro* biological activity of rh-CNTF and PEG rhCNTF was measured by chicken embryo dorsal root ganglion (DRG) culture. Results The mass ratio of rh-CNTF to PEG, rh-CNTF concentration and pH value showed significant effect on rh-CNTF PEGylation, while time and temperature had little influence on the modification effect. The optimal pH value was 6.5, concentration of rh-CNTF was 1 to 2 mg/ml, and mass ratio of rh-CNTF and PEG was 1:1 on modification condition. The *in vitro* biological activity of rh-CNTF was about 2 times higher than that of PEG-rhCNTF in chicken embryo dorsal root ganglion (DRG) culture. Conclusion Optimized parameters is obtained to modify rh-CNTF with mPEG-ButyrALD.

Key words: PEGylation; recombinant human ciliary neurotrophic factor; optimization

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是从鸡的眼组织睫状节中提取出来的,具有广泛的生物学活性,能促使多种神经细胞的存活、营养肌肉,促进糖、脂代谢和调节能量平衡以及摄食行为[1]。但CNTF同时具有强免疫原性、半衰期短、溶解度低、毒副作用大等缺陷,限制了其在临床的广泛应用。聚乙二醇(PEG)修饰技术是近年来发展的用于改进蛋白质类药物体内药物动力学性质的新技术,具有生物活性强、半衰期长、血药浓度峰值低且波动小、抗酶降解、免疫原性及抗原性降低、毒性小、溶解度增高等突出的优点[2,3]。本研究在表达和纯化重组人CNTF(rh-CNTF)的基础上,考察并优化了PEG修饰rh-CNTF的条件,旨在为合成单聚PEG-rhCNTF及其体内外活性实验的研究奠定基础。

基金项目: 重庆市自然科学基金(2007BB5254)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5254)
作者简介: 王 彦,女,重庆市人,博士研究生,主要从事蛋白药物开发及临床应用方面的研究。E-mail:sswdoctor@126.com
通信作者: 邱宗荫,电话:(023)68485727,E-mail: zongyin141@126.com
收稿日期: 2009-03-02;**修回日期:** 2009-03-18

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

rh-CNTF 原液(浓度为 10 mg/ml,缓冲为 100 mmol/L PB、pH 7.0)由本实验室制备,mPEG-ButyrALD(纯度 >95%,相对分子质量为 20×10^3)购自 Nektar 公司,氰基硼氢化钠(CH_3BNNa)溶液购自 ACROS 公司,SDS-PAGE 相关试剂及溶液和各种分析纯均为上海生工产品。恒温磁力搅拌仪(江苏中大仪器厂),电泳仪、DEAE Sepharose F. F. 、Superdex 75 凝胶、AKTA explore 层析系统、SDS-PAGE 电泳系统均购自 Pharmacia 公司。

1.2 rh-CNTF 的 PEG 修饰条件筛选

选取影响修饰工艺的 5 个主要参数[4],即修饰反应缓冲的 pH 值、rh-CNTF 与 PEG 的投料质量比、修饰反应的温度和反应时间、rh-CNTF 原液浓度进行试验。用 SDS-PAGE 检测反应条件对修饰产物成分的影响。用 mPEG-ButyrALD 修饰 rh-CNTF,反应液中含有 rh-CNTF、单聚及多聚 PEG-rhCNTF,以 N 端单聚 PEG-rhCNTF 在修饰产物中所占的最高比例来筛选修饰条件。

1.2.1 反应 pH 值 rh-CNTF 原液用 100 mmol/L PB(pH 5.0、pH 5.5 和 pH 6.5)缓冲液分别稀释样品至 2 mg/ml,各取 1 份加入 1 mol/L CH_3BNNa 母液(作为偶联活化剂)至溶液中,终浓度 20 mmol/L。按质量比 1∶2(rh-CNTF∶mPEG-ButyrALD)称取 mPEG-ButyrALD 加入 rh-CNTF 原液中。4 ℃,100 r/min 搅拌 24 h,分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.2 rh-CNTF 与 PEG 的修饰比例 rh-CNTF 原液用 100 mmol/L PB、pH 6.5 缓冲液稀释样品至2 mg/ml,补入 1 mol/L CH_3BNNa 母液,终浓度 20 mmol/L。按rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 质量比为 A(1∶1)、B(1∶2)、C(1∶3)、D(1∶4)、E(1∶5)分别称取 mPEG-ButyrALD,分别加入到 rh-CNTF 原液中,4 ℃,100 r/min 反应 24 h,分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 反应温度 rh-CNTF 原液用 100 mmol/L PB、pH 6.5 缓冲液稀释样品至 2 mg/ml,补入 1 mol/L CH_3BNNa 母液,终浓度为 20 mmol/L。取 rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 质量比 1∶1,分别在 4 ℃反应 12 h 和 24 h、25 ℃和37 ℃ 各反应 2 h 和 4 h,100 r/min,分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 rh-CNTF 浓度 rh-CNTF 原液用 100 mmol/L PB、pH 6.5 缓冲液稀释样品为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/ml 共 5 份,按 rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 质量比 1∶1 加入 mPEG-ButyrALD,4 ℃,100 r/min 反应 24 h,分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 反应时间 rh-CNTF 原液用 100 mmol/L PB、pH 6.5 缓冲液稀释样品至 2 mg/ml,补入 1 mol/L CH_3BNNa 母液,终浓度 20 mmol/L。取 rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 质量比 1∶1,4 ℃,100 r/min 反应,反应时间分别为 24、36、48 h,分别取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分析

制备凝胶并电泳[5],扫描后经凝胶系统分析。

1.4 修饰产物的分离纯化

PEG 修饰样品上样 DEAE Spharose F. F 层析柱,用 NaCl(60 mmol/L)洗脱,洗脱液再经 Superdex 75 凝胶层析,得到单聚 PEG-rhCNTF 产物。

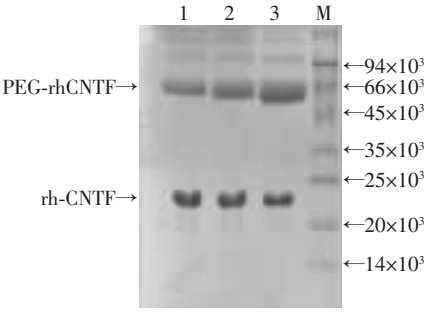
1.5 rh-CNTF 与 PEG-rhCNTF 体外生物活性测定[6]

10 日龄鸡胚(E40)背根神经节(DRG),在 D-Hanks 液中用 0.125% 胰酶消化并打散成 5×10^5 ml 的单细胞悬液,在 60 mm 塑料培养皿上预培养 4 h 以除去非神经元细胞,然后在依次用多聚鸟氨酸-层粘连蛋白包被过的 96 孔细胞培养板上,每孔加入 2 000 个神经元及 100 μl 含胎牛血清(10%)的 DMEM 培养液,分别加入 10 mmol/L rh-CNTF(设为阳性对照组)、10 mmol/L 分离纯化后的单聚 PEG-rhCNTF(设为实验组)、等量培养液(设为阴性对照组)。37 ℃、5% CO_2 下培养 24 h 后倾去培养液,用显微镜观察结果,对 0.3% 台盼蓝浸染 3 min 仍不着色的存活神经元计数,随机计数 50 个视野。

2 结果

2.1 修饰反应条件的优化

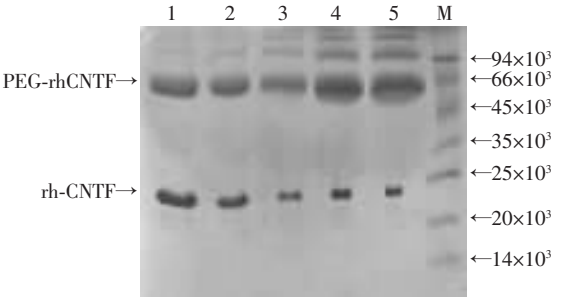
2.1.1 反应 pH 值对修饰产物的影响 3 种修饰条件下,pH 5.0 的修饰率最低,其次是 pH 5.5,但 pH 5.5 修饰条件下有少量蛋白质出现白色絮状沉淀,pH 6.5 的条件下修饰率最高。3 种修饰条件下生成的多聚 PEG-rhCNTF 产量无明显差距,故最后确立 100 mmol/L PB、pH 6.5 的反应缓冲。见图 1。



1:pH 5.0; 2: pH 5.5; 3: pH 6.5; M:标准

图 1 rh-CNTF 与 PEG 不同 pH 值缓冲时修饰产物的 SDS-PAGE 电泳结果

2.1.2 rh-CNTF 与 PEG 的修饰比例对修饰产物的影响 rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 质量比越大,修饰的多聚体所占比例越高。质量比为 1∶5时修饰产物中多聚体占 43.16%,而质量比为 1∶1时多聚体占 25.37%,质量比为 1∶2时多聚体占 29.08%。因此选择质量比为 1∶1的 PEG 修饰比例为最佳。因为在后面的纯化工作中发现高分子 PEG-rhCNTF 不容易从层析中分开。见图 2。



1:1:1; 2:1:2; 3:1:3; 4:1:4; 5:1:5; M:标准

图 2 rh-CNTF 与 PEG 不同质量比时修饰产物的 SDS-PAGE 电泳结果

2.1.3 反应温度对修饰产物的影响 3 种不同温度条件下,修饰率基本一致,随时间的延长,修饰率越高。但是考虑到生物蛋白在低温下更稳定,故选择了 4 ℃为修饰反应的温度条件。

2.1.4　rh-CNTF 浓度对修饰产物的影响　　SDS-PAGE 电泳扫描后经凝胶系统分析,得到表 1 所示各条带比例。rh-CNTF 的 PEG 修饰效率随着 rh-CNTF 浓度的升高而提高,但是在 5 mg/ml 时修饰的多聚体明显增多,影响了有效修饰。最终确定 rh-CNTF 浓度为 1 ~ 2 mg/ml 进行修饰。

表 1　不同 rh-CNTF 浓度下修饰产物所占比例(%)

条件	rh-CNTF	PEG-rhCNTF	多聚 PEG-rhCNTF 1	多聚 PEG-rhCNTF 2
1 mg/ml	20.17	49.58	13.28	16.97
2 mg/ml	19.35	49.87	13.58	17.20
3 mg/ml	21.99	48.77	12.59	15.64
4 mg/ml	26.47	42.53	14.35	16.65
5 mg/ml	27.41	40.70	14.57	17.32

2.1.5　反应时间对修饰产物的影响　　随修饰时间的延长,单聚 PEG-rhCNTF 未见明显增多,但多聚 PEG-rhCNTF 在修饰产物中所占比例明显增高,故选择过夜 24 h 反应条件。

2.2　优化反应条件的确立

选定 rh-CNTF 与 PEG 的修饰条件如下:用 100 mmol/L PB pH 5.0 将 rh-CNTF 原液稀释至 1 ~ 2 mg/ml,补入终浓度 20 mmol/L 的 CH_3BNNa 母液,按质量比为 1∶1(rh-CNTF∶mPEG-ButyrALD)加入 mPEG-ButyrALD,4 ℃,100 r/min,过夜 24 h 反应。

2.3　修饰产物的分离纯化

PEG 修饰样品,经 DEAE Sepharose F. F 层析柱纯化后,目的蛋白纯度达到 90%;再经 Superdex 75 凝胶层析后,单聚 PEG-rhCNTF 纯度达到 95% 以上。

2.4　rh-CNTF 与 PEG-rhCNTF 体外生物活性比较

PEG-rhCNTF 组、rh-CNTF 组和对照组的存活细胞数分别为(85 ± 7)、(173 ± 12)和无生长($P < 0.01$),表明 PEG-rhCNTF 和 rh-CNTF 均对鸡胚背根神经有营养作用,但 PEG-rhCNTF 的促神经生长的作用明显低于 rh-CNTF。

3　讨论

聚乙二醇修饰药物目前的发展主方向为定点修饰[7],单修饰物异构体鉴定构效学关系等。根据所修饰基团的不同,PEG 定点修饰蛋白质多肽的方式主要可以分为 4 类[8]:N 端氨基定点修饰、巯基定点修饰、羟基定点修饰、糖类残基和 N 端氧化后定点修饰。现阶段主要以巯基和 N 端氨基定点修饰为主[9]。为避免铰链产物或多聚物的生成,用于蛋白类药物修饰的 PEG 通常为一端甲氧基化的 PEG(monomethoxy PEG,mPEG)。能与 N 端氨基发生定点修饰反应的 PEG 修饰剂有 mPEG-丙酸琥珀酰亚胺酯、mPEG-琥珀酰亚胺酯、mPEG-三氟乙磺酸酯等。由于 mPEG-醛修饰条件温和,交联时不引入其他活性基团,在低 pH 下只修饰 N 端氨基,对活性影响小,所以本研究选用 mPEG-ButyrALD 对 rh-CNTF 进行 N 端氨基定点修饰。

在弱酸性条件下,蛋白质多肽中大部分 pKa 值较大的亲核氨基会结合质子呈阳离子形式,而 α-氨基一般具有较小的 pKa 值,且醛只与伯胺偶联形成 Shiff 碱的,于是醛可以偶联到伯胺上,并在硼氢甲腈钠还原下得到稳定的仲胺结构,故 N 端 α-氨基在较低 pH 下经 mPEG 醛修饰即可达到 N 端定点修饰的目的。而且,mPEG-ButyrALD 的活性基团是醛基,它在偏酸性条件下有较高的活性。修饰 pH 值越高,蛋白越容易被修饰为多聚体或者修饰位点发生变化[4]。而且由于 rh-CNTF 等电点为 5.98,在 pH 6.0 附近容易沉淀,故不能在 pH 6.0 条件下进行反应。为了达到最佳修饰效率,本研究以 SDS-PAGE 为检测条件,以 N 端单聚 PEG-rh-CNTF 在修饰产物中所占的最高比例为标准,详细研究了修饰反应缓冲的 pH 值、PEG 与 rh-CNTF 的质量修饰比例、修饰反应温度和反应时间及 rh-CNTF 浓度对修饰产物的影响。研究结果表明:4 ℃、100 r/min 和 24 h,100 mmol/L PB、pH 6.5 反应缓冲将 rh-CNTF 浓度稀释为 1 ~ 2 mg/ml,与修饰剂的质量比为 1∶1 为 rh-CNTF 最佳 PEG 定点修饰方式。

本课题研制的 rh-CNTF 由 185 个氨基酸组成,经四级杆质谱(Agilent 1956BLC/MSD)测定 rh-CNTF 相对分子质量为 21 108.74,本研究采用的 mPEG 相对分子质量为 20×10^3,分离纯化所得的修饰产物单聚 PEG-rhCNTF 的相对分子量由质谱测定值为 42 214.33(2.6%),符合 rh-CNTF 与 mPEG-ButyrALD 之和,证明修饰产物单聚 PEG-rhCNTF 为 1 个 PEG 分子连接 1 个 rh-CNTF 分子。而在 SDS-PAGE 电泳图谱上的单聚 PEG-rhCNTF 的条带约位于 60×10^3 的位置,远高于二者之和,与质谱分析结果不符,原因可能是:①偶联到 rh-CNTF 上的 PEG 中含有大量乙氧基,能够与水形成氢键,大大降低了蛋白的电泳迁移速率;②PEG 与 SDS 结合的比率不清,可能与 SDS 结合能力小,迁移速度低[10]有关。rh-CNTF 经 PEG 化学修饰后其体外生物活性不到修饰前活性的一半,其原因可能为 rh-CNTF 需要与细胞表面的特异性受体相结合,通过信号传递,才能引发一系列特定的生化反应,刺激细胞内多种效应蛋白分子的合成,从而发挥 rh-CNTF 的生物学功能。由于化学修饰过程中与大分子的化学物质结合影响子 rh-CNTF 分子的空间结构[11],并且线性大分子 PEG 在 rh-CNTF 分子表面包裹缠绕,形成了一道分子屏障,阻碍 rh-CNTF 的活性部位与其受体结合,从而影响了促神经生长作用的发挥。然而这些结果是在体外测出的,在体内,由于受多种因素的影响,其生物学活性的发挥还有待进一步研究。

在优化的反应条件下,rh-CNTF 与 PEG 成功偶联;通过 DEAE 弱阴离子交换层析和凝胶过滤层析可以得到纯度较高的单聚 PEG-rhCNTF。本研究所用的 mPEG-ButyrALD 进行蛋白质 PEG 修饰主要位于 N 末

端的 NH_2 残基,同时有部分修饰在赖氨酸(Lys)的 ω-NH_2 残基上,由于 rh-CNTF 分子中存在数个 Lys,即便是都是单聚 PEG-rhCNTF,修饰产物也往往是不均一的。本研究将在后期的工作中,对修饰产物 PEG-rhCNTF 的修饰位点、理化性质、结构特征、体内半衰期及免疫原性等进一步研究,考察 rh-CNTF 经 PEG 修饰后能否最终克服其原有的缺点,成为修复营养神经、调节物质代谢和能量代谢的改良药物。

参考文献:

[1] Mori M, Jefferson J J, Hummel M, *et al*. CNTF: a putative link between dopamine D2 receptors and neurogenesis[J]. J Neurosci, 2008, 28(23): 5867 - 5869.

[2] Ryan S M, Mantovani G, Wang X, *et al*. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(4): 371 - 383.

[3] 王 彦, 范 开, 夏永鹏. 重组人睫状神经因子的表达、纯化以及聚乙二醇修饰[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1181 - 1184.

[4] Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati S A, *et al*. A method to optimize PEG-coating of red blood cells[J]. Bioconjug Chem, 2006, 17(5): 1288 - 1293.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版[M]. 第 3 部. 北京: 化学工业出版社,2005.

[6] Li H, Ma Y, Su T, *et al*. Expression, purification, and characterization of recombinant human neurturin secreted from the yeast Pichia pastoris[J]. Protein Expr Purif, 2003, 30(1): 11 - 17.

[7] Fontana A, Spolaore B, Mero A, *et al*. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(1): 13 - 28.

[8] Marsac Y, Cramer J, Olschewski D, *et al*. Site-specific attachment of polyethylene glycol-like oligomers to proteins and peptides[J]. Bioconjug Chem, 2006, 17(6): 1492 - 1498.

[9] Gabriel N E, Farrar C E. N-terminally chemically modified protein compositions and methods: US, 7090835[P]. 2006-08-15.

[10] Youn Y S, Na D H, Lee K C. High-yield production of biologically active mono-PEGylated salmon calcitonin by site-specific PEGylation [J]. J Control Release, 2007,117(3): 371 - 379.

[11] Hu K, Li J, Shen Y, *et al*. Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. J Control Release, 2009, 134(1): 55 - 61.

(编辑 汪勤俭)

(上接 1336 页)

组比较差异无统计学意义($t=0.11$, $P>0.05$)。喘息每次急性发作天数分别为 A 组(3.93 ± 1.25)d,B 组(3.71 ± 1.07)d,C 组(6.33 ± 1.72)d,A、B 组与 C 组比较每次急性发作天数缩短,差异有统计学意义($t=5.23$、5.28, $P<0.01$);但 A 组与 B 组比较差异无统计学意义($t=0.60$, $P>0.05$)。A、B 组每次喘息急性发作临床分度较 C 组轻,差异有统计学意义($\chi^2=8.33$、11.83, $P<0.05$、0.01);但 A 组与 B 组比较差异无统计学意义($\chi^2=1.13$, $P>0.05$)。A 组有 2 例出现鹅口疮终止吸入后消失,B、C 组无不良反应出现。

3 讨论

婴幼儿喘息临床表现为咳嗽、喘鸣、呼吸短促、夜间憋醒及喂养困难,甚至呼吸困难,体检肺部可闻及哮鸣音,或伴湿啰音,病情轻重不一,有时可能危及生命。病因多种,常由病毒感染诱发,伴有特异性体质或特应性家族史的患儿是日后发生持续性喘息(哮喘)的高发人群[1]。呼吸道合胞病毒感染(RSV)是婴幼儿呼吸道感染最常见的病原体,是引起毛细支气管炎喘息发作的主要原因,日后和哮喘的发病密切相关[2]。

儿童喘息与成人不同,部分患儿喘息在 6 岁左右及青春期前后由于自身的皮质激素的升高及免疫耐受的出现,可不再发或很少发,达到临床治愈[3]。根据 GINA 的规定,必须是轻度持续以上的哮喘患者、哮喘发作每周 1 次以上或肺功能异常达到一定程度才需要长期使用吸入糖皮质激素,但实际上在婴幼儿期如此频繁发作的患儿并不多见,而婴幼儿的肺功能检测又多难进行,因此国内外许多学者对有可能发展为哮喘的喘息儿童大力提倡早期干预治疗,追踪观察。而糖皮质激素局部吸入因其具有强效抗炎作用和降低气道高反应,全身副作用较少,被推荐为防治哮喘的第一线药物,但对哪一种喘息儿童应进行早期干预,如何干预,目前说法不一,值得进一步探讨。

本课题对反复发作喘息,特别是伴有特应性体质或特应性体质家族史的婴幼儿及毛细支气管炎患儿进行早期长期或间歇吸入布地奈德干预治疗。研究显示:长期或间歇吸入布地奈德均能明显减少婴幼儿喘息发作次数、天数及严重度,但长期吸入布地奈德是否有副作用是人们普遍关注的问题。有研究显示长期吸入布地奈德并不能改变喘息性疾病的预后,停药后发作次数又增加[4],且长期吸入布地奈德患儿依从性差,婴幼儿不会漱口,易至口腔霉菌感染;间歇雾化吸入布地奈德患儿依从性好,未见明显不良反应,有利于身心健康,值得临床推荐应用。建议间歇雾化吸入布地奈德要在早期,在可能出现咳喘时就应雾化吸入,不要等到出现明显气喘后。间歇吸入皮质布地奈德能否防止气道重塑,尚需进一步研究。

关键词: 吸入;布地奈德;喘息;婴幼儿
中图法分类号: R725.6 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Taussig L M, Wright A L, Holberg C J, *et al*. Tucson children's respiratory study: 1980 to present[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(4): 661 - 675.

[2] 陈彩霞, 单 晔, 葛 蕾, 等. 婴幼儿喘息与呼吸道合胞病毒肺炎支原体感染及过敏的关系[J]. 中国实用儿科杂志, 2007, 22(12): 908 - 910.

[3] 李明华, 殷凯生, 柴映云. 哮喘病学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 760 - 763.

[4] 竺康强, 高 翔, 钮文思. 吸入布地奈德对哮喘性支气管炎患儿预后的临床观察[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(2): 28 - 29.

(编辑 王小寒)