透性升高的正相关性支持这一结论。

综上所述,胸部开放伤后海水、淡水浸泡致ALI的基本病理生理改变相似,都是炎症反应和细胞损伤,但病理反应和损伤程度海水组明显重于淡水组。淡水浸泡病理变化以炎症反应为主,细胞损伤不明显,肺泡毛细血管膜通透性改变小,因此渗出性水肿较海水浸泡程度明显减轻,预后好。海水的高渗环境加重了肺泡细胞、毛细血管内皮细胞的损伤和炎症反应的程度,使肺泡通透指数明显升高,加重渗出性肺水肿,导致更严重的损伤。提示胸部开放伤海水浸泡致ALI病情危重的重要因素是海水的高渗环境。其救治措施也有别于一般创伤和淡水浸泡,及时补充低张液体降低血浆渗透压尤为关键,液体管理是海战伤ALI救治研究不能忽略的环节。

参考文献:

[1] 沈宏亮,王 强. 海水浸泡创伤病理生理变化和救治措施的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(12): 1365-1367.
[2] 虞积耀,赖西南,李 辉,等. 战伤合并海水浸泡生存时间及死亡率的动物实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(3): 268-269.
[3] 孟继光,段蕴铀,薛志强,等. 胸部开放伤后海水灌入胸腔致急性肺损伤犬模型的实验研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2008, 15(2): 74-77.
[4] Haddadel B, McCluskie K, Birrell M A, *et al*. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation[J]. J Immunol, 2002, 169(2): 974-982.
[5] Guo R F, Ward P A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(3): 303-310.
[6] Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation [J]. Pharmacol Ther, 2002, 94(3): 185-211.
[7] Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(4): L566-L577.
[8] Shames B D, Zallen G S, McIntyre R C Jr, *et al*. Chemokines as mediators of diseases related to surgical conditions[J]. Shock, 2000, 14(1): 1-7.
[9] Varol E, Ozaydin M, Sahin M, *et al*. vWF levels as a circulating marker of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Indian Heart J, 2005, 57(6): 655-657.

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2009)21-2093-01

个案与短篇

重庆三峡库区部分地域猪博尔纳病病毒自然感染状况调查

朱 丹[1],张英英[1],展群岭[1],余建萍[1],曾志磊[1],徐鸣明[1],胡永波[1],陈 晓[1],彭 丹[1],霍 康[1],谢 鹏[1,2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经内科,[2]神经科学研究中心,重庆 400016)

博尔纳病病毒(Borna disease virus,BDV)是一种非细胞溶解的单股负链嗜神经RNA病毒,可引起人畜共患病博尔纳病。目前研究表明,BDV几乎可感染所有的温血动物[1],但其流行现况尚不完全清楚。本研究采用改进的巢式逆转录酶聚合酶链反应(nRT-PCR)检测重庆三峡库区部分地域健康猪外周血单核细胞(PBMCs)BDV P24基因片段,对阳性产物进行测序分析,了解该地域BDV自然感染状况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

360例健康猪(雌雄各半)来自重庆三峡库区(合川、荣昌、涪陵、云阳等养猪大县)。采集猪外周血10 ml加EDTA抗凝待检测。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z196)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program)(2006AA02Z196)
作者简介:朱 丹,女,重庆市人,博士研究生,主要从事中枢神经系统感染等方面的研究。E-mail:zhudan25@gmail.com
通信作者:谢 鹏,E-mail:peng.xie58@gmail.com
收稿日期:2009-03-22;修回日期:2009-04-27

1.2 引物和探针

根据GenBank BDV基因组保守区编码BDV p24第二开放阅读框(ORFⅡ)的核苷酸序列,设计了2对引物和1条探针,其中外引物序列为P1:5′-TGACCCAACCAGTAGACCA-3′,P2:5′-GTCCCATTCATCCGTTGTC-3′,内引物序列为P3:5′-CCCTCCAAGTGGAAACCAT-3′,P4:5′-CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA-3′,引物由上海英骏生物有限公司合成;荧光探针序列为:5′-FAM-TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAGC-TAMRA-3′,由中山医科大学达晖基因诊断中心合成。

1.3 RNA的提取

将EDTA抗凝的外周血用Ficoll-conray液密度梯度离心法分离PBMCs,随后用Trizol一步法提取RNA。提取的RNA样本用紫外分光光度计测260、280 nm处的吸光度值*D*(260)和*D*(280),并计算二者比值以分析RNA样品的纯度。使用随机数字表法选择8例PBMCs样本提取的RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳分析所提取的RNA样品完整性。

1.4 样本的BDV检测

本研究采用改进的nRT-PCR方法,即在常规nRT-PCR的基础上,第2轮PCR过程中加入*Taq*Man荧光探针。在检测中均设置阴性对照(非模板)和阳性对照(PMD19质粒标准品)以

(下转2105页)

与疾病活动性相关,但是否有显著差异性与样本的选择可能存在关系,需要多中心,大样本的研究以明确结论。

本研究通过对401 例患者的问卷评分后得出HAQ 在各证型间有统计学差异。其中以热证的得分最高,而HAQ 主要是针对患者日常生活情况的问卷,说明热证患者自我感觉很差,生活受到的影响最大。多数研究发现RA 活动期多见湿热阻络型[13,14]。活动期或者急性发作时关节肿胀、疼痛、晨僵等症状明显,则患者感日常生活困难,生活质量下降。HAQ 虽有很强的主观性,但是可以在一定程度上反应疾病的情况。在中医治疗评价中不妨引入该指标进行评定疗效。

本研究结果虽受样本数量及病例来源地区所限,但研究思路及方法是可行的。课题组正在继续收集样本,希望能与其他地区合作收集更多的 RA 中医症状资料,为 RA 中医"证"的客观化、科学化提供依据,并归纳出 RA 的中医证候分型标准。

参考文献:

[1] 刘孟渊. 类风湿性关节炎的证治体会[J]. 中医杂志, 2001, 42(8): 465 - 466.

[2] 雷裕后. 分期辨治类风湿性关节炎 32 例[J]. 实用中医药杂志, 2004, 20(3): 127.

[3] 李如意. 中医分期辨证治疗类风湿性关节炎 60 例[J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 23(1): 38 - 39.

[4] 石　磊,杨秀清. 类风湿性关节炎的中医辨治初探[J]. 现代中医药, 2005, 25(1): 32 - 34.

[5] 王衍全,刘　斌,程少丹. 类风湿性关节炎的辨治体会[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(3): 87 - 89.

[6] 朱平东,廖英琼. 类风湿性关节炎的分型论治体会[J]. 新疆中医药, 2005, 23(6): 21 - 22.

[7] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(4): 250 - 254.

[8] 孟庆刚,王永炎,戴汝为. 系统复杂性的中医证候规范化研究探析[J]. 中医药学刊, 2003, 21 (12): 2015, 2025.

[9] 查青林, 林色奇, 吕爱平. 多元统计分析在中医证候研究中的应用探析[J]. 江西中医学院学报, 2004,16(6): 79 - 80.

[10] 谢丽萍, 肖　敬, 史　伟, 等. 广西地区类风湿关节炎中医证候分布的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 380 - 381.

[11] 姜　泉,蒋　红,曹　炜,等. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 253 - 255.

[12] 王宪庆, 许金凤. 从肝论治类风湿性关节炎[J]. 中医药学报, 1999, 27(4): 26.

[13] 肖云松. 辨证治疗类风湿性关节炎 33 例[J]. 中国民间疗法, 2002, 10(4): 53 - 54.

[14] 何羿婷,付丽媛,阎小萍,等. 类风湿性关节炎中医证候分布规律的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2004, 10(1): 26 - 28.

[15] 左新松. 类风湿性关节炎血小板与病情活动相关性的探讨[J]. 中外医疗, 2008, (15): 61 - 62.

(编辑　吴培红)

(上接 2093 页)

排除假阳性和假阴性。

1.5　扩增产物测序和序列分析

PCR 扩增产物送上海生工有限公司测序。采用 GenBank 中 Blast 对 BDV p24 核苷酸和氨基酸序列与 BDV 标准株 Strain V 和 He/80 等进行比对分析。

2　结果

2.1　RNA 的提取质量

随机选择 8 例外周血样本 RNA,紫外分光光度计测 $D(260)$ 和 $D(260)$值,比值为 1.80 ~ 1.97。琼脂糖凝胶电泳可见明显的 28S、18S、5S 3 条带,其中 28S 与 18S 的亮度约为 2∶1,提示所提取的 RNA 样品纯度较高,完整性良好。

2.2　样本的 BDV 检测结果

结果发现,360 例健康猪中 16 例 BDV P24 基因片段检测阳性,其余样本均为阴性。

2.3　PCR 扩增产物的电泳和测序鉴定

琼脂糖凝胶电泳显示,阳性样本在 86 bp 出现清晰条带。所测序列采用 GenBank Blast 进行比对分析。结果发现,扩增序列与 BDV 标准病毒株 He/80(Access Number:L27077) 序列一致,同源性一致性为 100%;与 Strain V(Access Number:)和 Strain H1766(AJ311523.1)比对,变异程度均小于 7%,所编码的氨基酸序列亦无变化。

3　讨论

国外研究多采用抗原和抗体等方法检测 BDV,近年来亦开始使用分子生物学技术检测 BDV 核酸。本研究采用改进的巢式 RT-PCR 方法,进一步增加了检测的特异性和敏感性,同时具有省力、省时、定量和实时的特点[2]。

本研究对重庆三峡库区 360 例猪的 PBMCs 进行了 BDV 检测。结果发现 BDV 阳性率均为 4.44% (16/360)。基因序列分析表明,重庆地区猪感染 BDV 核苷酸序列与 BDV 标准病毒株 He/80 序列完全一致,同源性为 100%。有研究表明,BDV 不同于其他 RNA 病毒,是一种罕见的极其保守的 RNA 病毒,具有很强的遗传稳定性。不同种属的动物感染,其变异率极低。本研究结果提示重庆三峡库区部分地域健康猪中可能存在 BDV 的自然感染。目前检出的阳性样本主要来自本地,病毒株来源尚无法做出全面的解释。因此,尚需进一步的研究,揭示 BDV 的流行规律,为预防和控制打下基础。

关键词: 博尔纳病病毒;巢式 RT-PCR;*Taq* Man 探针;猪
中图法分类号: R181.34　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Wood F, Bloor M J. Borna disease virus: the generation and review of a scientific study[J]. Soc Sci Med, 2006, 63(4): 1072 - 1083.

[2] Wensman J J, Thoren P, Hakhverdyan M, *et al*. Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus[J]. J Virol Methods, 2007, 143(1): 1 - 10.

(编辑　张　维)