文章编号:1000-5404(2011)13-1323-05

论著

博尔纳病病毒荧光定量PCR试剂盒扩增缓冲液的优化

金 戈[1,2],徐晓艳[1,2],张 亮[1,2],马丽华[1,2],黄荣忠[1,2],邓 婧[1,2],李文娟[1,2],房 亮[2],谢 鹏[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学 附属第一医院神经内科[1],神经科学研究中心,重庆市神经生物学重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 选择并优化博尔纳病病毒荧光定量PCR *Taq*Man探针法反应体系中的扩增缓冲液,使PCR反应体系对该病毒p24模板基因的扩增效率得到明显提高。**方法** 通过常规PCR比较选择3种常用酸(盐酸、磷酸和硫酸)所滴定的缓冲液体系,在其基础上选择适合浓度的硫酸铵配制TSS buffer,在TSS buffer中分别加入四甲基氯化铵、Triton X-100、二甲亚砜和甜菜碱这4种常用的PCR添加剂,并确定各自的最佳工作浓度,选择扩增效果较好的添加剂与其他添加剂进行依次组合,寻找最佳的添加剂组合,最后用荧光定量PCR进行对比验证。**结果** 在滴定酸上选择了效果最好的硫酸,配制TSS buffer硫酸铵的最佳终浓度为6 mmol/L。在添加剂的优化组合上,1.5 mol/L甜菜碱、0.15% Triton X-100、8 mmol/L四甲基氯化铵和TSS buffer组合成的TBTT buffer效果最佳,在其与TaKaRa PCR buffer的对比中,TBTT buffer效果明显好于后者。**结论** 成功研制优化出适合扩增博尔纳病病毒p24模板基因的扩增缓冲液。

【关键词】 PCR扩增缓冲液;PCR试剂盒;博尔纳病病毒
【中图法分类号】 Q93-335;R373.31 **【文献标志码】** A

Optimization of PCR buffer for Borna disease virus real-time PCR diagnostic kit

Jin Ge[1,2], Xu Xiaoyan[1,2], Zhang Liang[1,2], Ma Lihua[1,2], Huang Rongzhong[1,2], Deng Jing[1,2], Li Wenjuan[1,2], Fang Liang[2], Xie Peng[1,2] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, [2]Neuroscience Center, Key Laboratory of Neurobiology of Chongqing, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To select and optimize the PCR buffer for Borna disease virus real-time fluorescence quantitative PCR diagnostic kit in order to significantly improve PCR amplification efficiency to BDV p24 gene. **Methods** Conventional PCR was used to contrast the PCR buffers which titrated with hydrochloric acid, phosphoric acid and sulfuric acid respectively, and the appropriate concentration of ammonium sulfate was further explored to prepare TSS buffer. Four PCR additives (TMAC, Triton X-100, DMSO and betaine) were added into TSS buffer respectively to determine each optimal working concentration. One appropriate additive was mixed into other additives by turns in order to find out the most effective combination. Finally the efficiency of these different PCR buffers was verified by real-time PCR. **Results** Compared to other acids, sulfuric acid was more suitable to titrate the buffer. The optimal concentration of ammonium sulfate was identified as 6 mmol/L to prepare TSS buffer. Furthermore, real-time PCR results indicated that TBTT buffer (TSS buffer mixed with 1.5 mol/L betaine, 8 mmol/L TMAC, and 0.15% Triton X-100) was the most effective buffer compare to other PCR additive mix and was more effective to amplify p24 gene than Takara PCR buffer. **Conclusion** The PCR buffer for amplifying BDV p24 gene is successfully optimized.

【Key words】 PCR buffer; PCR kit; Borna disease virus

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB918302), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5393), and the Medical Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-102). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: xiepeng58@21cn.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB918302);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5393);重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2010-2-102)
【通信作者】 谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail:xiepeng58@21cn.com

博尔纳病病毒(*borna disease virus*, BDV)是一种嗜神经性的单股负链RNA病毒,临床上表现为致死性的脑脊髓炎,BDV的感染宿主包括了马、羊、啮齿类等大部分温血动物,而BDV的慢性感染也可能于人类精

神疾病有关[1]，在我国重庆和宁夏等地区动物、精神疾病患者和脑炎患者中均有散在BDV疑似阳性病例报道[2-4]。BDV基因组含有6个开放式读码框(open reading frame，ORF)，其中ORFⅠ和ORFⅡ分别编码核蛋白(p40)和磷蛋白(p24)，p24基因由于序列高度保守[5]，并且在检测同等病毒量时其敏感性要高于p40基因[6]，故是检测BDV核酸的主要指标。实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction)*Taq*Man探针法除了具有常规PCR的高灵敏性外，定量和扩增同步进行，特异性和可靠性更强，并且封闭不易污染，是检测博尔纳病病毒的一种重要方法。本研究在研制BDV Real-time PCR诊断试剂盒中首先确定和优化适合p24基因扩增的扩增缓冲液(以下简称buffer)，使之能够明显提高PCR反应体系对该病毒p24模板基因的扩增效率。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

荧光定量PCR仪为澳大利亚Corbett Research公司生产的Rotor-Gene 6000，常规PCR仪购自德国Biometra公司，凝胶成像系统为美国BIO-RAD公司生产的ChemiDoc™ XRS。HotStart *Taq*酶、dNTPs和DL2000 DNA Marker均购自TaKaRa公司，四甲基氯化铵(TMAC)、二甲亚砜(DMSO)、Triton X-100均购自上海生工，甜菜碱(betaine)购自Sigma公司，其余试剂均为国产或进口分装分析纯，p24重组质粒由本实验室构建并保存。

1.2 引物和探针

均由上海英骏(Invitrogen)生物技术有限公司合成和标记，上游引物：5′-GGCTCGTATCGAGGCAGGGT-3′，下游引物：5′-GGCGGTTGATGCGTAGAGGA-3′，*Taq*Man探针：5′-(FAM)TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAGC(TAMRA)-3′，该引物扩增的目的片段长度为199 bp。

1.3 实验中所用buffers

所有buffer均用高压处理后的超纯水(MilliQ Water)配制，配制完成后用孔径为0.22 μm的滤膜进行过滤，pH值的滴定均在室温(25 ℃)下进行(表1)。

表1 博尔纳病病毒荧光定量PCR试剂盒扩增缓冲液配方

buffer	pH值(25℃)	buffer成分(10×)
Tris-Hcl buffer	8.3	100 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L KCl，20 mmol/L $MgCl_2$
Tris-H_3PO_4 buffer	8.3	100 mmol/L Tris-H_3PO_4，500 mmol/L KCl，20 mmol/L $MgCl_2$
Tris-H_2SO_4 buffer	8.3	100 mmol/L Tris-H_2SO_4，500 mmol/L KCl，20 mmol/L $MgCl_2$
TSS buffer	8.3	100 mmol/L Tris-H_2SO_4，500 mmol/L KCl，20 mmol/L $MgCl_2$，60 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$
TaKaRa PCR buffer	8.3	100 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$

1.4 方法

1.4.1 常规PCR反应液体系 每管反应体积均为20 μl，反应液中应包括1×buffer(表1)、上下游引物各10 pmol(终浓度为0.5 μmol/L)、2.5U TaKaRa HS *Taq*酶、终浓度为0.2 mmol/L的dNTPS和1 μl 1×10^7拷贝/μl的p24质粒。

1.4.2 常规PCR反应条件 95 ℃ 5 min(预变性)→95 ℃ 30 s(变性)、62 ℃ 30 s(退火)、72 ℃ 30 s(延伸)，共30个循环。

1.4.3 Real-time PCR反应液体系 除加入10 pmol的探针(终浓度为0.5 μmol/L)外，其余同常规PCR。

1.4.4 Real-time PCR反应条件 95 ℃ 5 min(预变性)→95 ℃ 30 s(变性)、62 ℃ 45 s(退火+延伸)，共进行40个循环，设置在延伸时收集荧光信号。

1.4.5 基础buffer滴定酸的选择 配制Tris-HCl、Tris-H_3PO_4和Tris-$H_2SO_4$3种buffer，分别使用盐酸、磷酸和硫酸在室温下滴定至8.3，将这3种buffer加入常规PCR反应体系对模板进行扩增，PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳并使用凝胶成像仪进行拍照比较。

1.4.6 TSS buffer的配制 在Tris-H_2SO_4 buffer的基础上分别依次加入终浓度为2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 mmol/L的硫酸铵，同时使用不加硫酸铵的反应体系作为对照，选择出效果最好的浓度。

1.4.7 PCR添加剂浓度的优化 在TSS buffer的基础上分别加入4种常用的PCR添加剂(TMAC、Triton X-100、DMSO和甜菜碱)，其中加入反应体系后TMAC终浓度依次为1、2、3、4、5、6、8、10 mmol/L；Triton X-100终浓度依次是0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.15%、0.175%、0.2%；DMSO终浓度依次为0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%；甜菜碱终浓度依次为0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2 mol/L，根据PCR结果分析并选择出每种添加剂对于p24模板的最佳工作浓度。

1.4.8 添加剂的组合优化 选择1种扩增效果较好且随浓度变化影响较小的添加剂，在其最佳浓度的基础上分别加入其他3种不同浓度的添加剂，从中对比选择出效果最好的组合，并且在该添加剂组合基础上再次分别增加剩余的2种添加剂，摸索3种添加剂的组合是否可以进一步提高扩增效率。最后使用Real-time PCR比较验证buffer的效果，制作标准曲线并同TaKaRa商品化buffer进行对比。

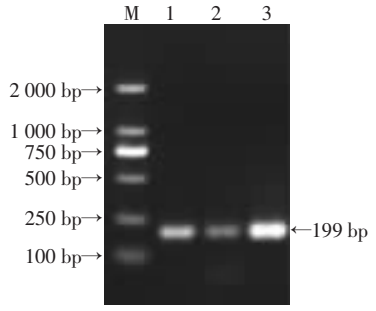
2 结果

2.1 选择效果最佳的滴定酸

图1可见Tris-H_2SO_4 buffer对模板的扩增效果明显好于另外2种buffer。在将镁离子加入磷酸滴定的buffer时出现浑浊，考虑由于发生化学反应产生磷酸镁或磷酸一氢镁导致出现沉淀，从而可能影响扩增效率以及试剂盒的稳定性，故最终选择硫酸来作为合适的滴定酸。

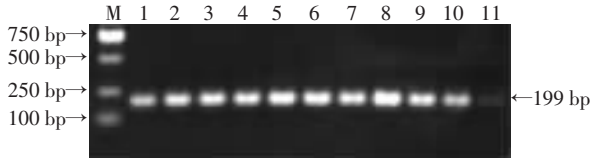
2.2 确定硫酸铵最佳浓度

PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果可见加入硫酸铵后条带亮度均有所增高，在终浓度为6～12 mmol/L时效果较好，而6 mmol/L时扩增效果最佳(图2)。在Tris-H_2SO_4 buffer的基础上加入该浓度的硫酸铵，并命名为TSS buffer。



M :DL 2000 DNA 标准 ;1 :Tris-HCl buffer ;2 :Tris-H_3PO_4 buffer ; 3 :Tris-H_2SO_4 buffer

图 1　分别使用 3 种酸滴定的基础 buffer 扩增效果的比较

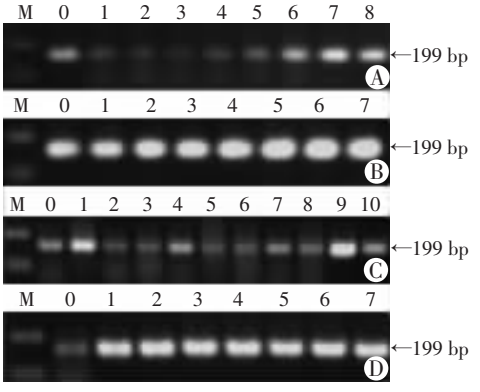


M :DL 2000 DNA 标准 ;1 :20mmol/L ;2 :18 mmol/L ;3 :16 mmol/L ; 4 :14 mmol/L ;5 :12 mmol/L ;6 :10 mmol/L ;7 :8 mmol/L ;8 :6 mmol/L ; 9 :4 mmol/L ;10 :2 mmol/L ;11 :不加硫酸铵的对照管

图 2　不同浓度的硫酸铵对 PCR 扩增效果的影响

2.3　PCR 添加剂浓度的优化

结果显示 Triton X-100 和甜菜碱的扩增效果较另外 2 种好(图 3)。TMAC 在低浓度时对于 PCR 反应甚至有抑制,但随着浓度的升高效果也逐渐好转,在终浓度为 8 mmol/L 时效果最佳。而 DMSO 对于 PCR 反应的稳定性上相对较差,没有形成一个较明显的梯度,条带显得较乱,在终浓度为 3.5% 时条带最亮。Triton X-100 浓度从低到高依次可见条带亮度逐渐增强,至终浓度为 0.15% 时效果较好并在之后变化不大。而加入甜菜碱后扩增效果也得到显著提高,条带亮度随甜菜碱浓度改变而变动不大,根据结果可以确定最佳浓度范围为 0.75 ~ 1.5 mol/L。总体分析加入以上几种添加剂后,PCR 的扩增效果较之不加添加剂的 TSS buffer 均有不同程度改善,并且每种添加剂的最佳浓度范围都得以确定。

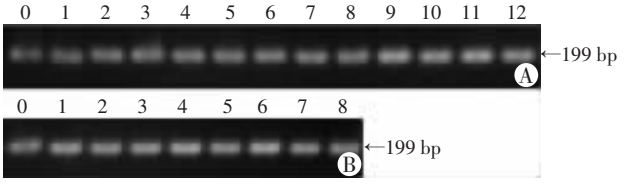


A :TMAC　1 – 8 :浓度为分别为 1、2、3、4、5、6、8、10 mmol/L ; B :Triton X-100　1 – 7 :浓度分别为 0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.15%、0.175%、0.2% ;C :DMSO　1 – 10 :浓度分别为 0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4% ; D :甜菜碱　1 – 7 :浓度分别为 0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2 mol/L ; M :DL200 DNA 标准 0 :未加添加剂

图 3　不同浓度的各种 PCR 添加剂对 PCR 扩增效果的影响

2.4　添加剂的组合优化

从图 3 中可以看出甜菜碱可以明显增强对于模板基因的扩增,并且随着浓度的变化条带亮度的改变不是很大,说明对于 PCR 反应体系的作用较稳定。结合文献结果选取终浓度为 1.5 mol/L 的甜菜碱,分别加入不同浓度的 TMAC、DMSO 和 Triton X-100 进行组合(图 4A),结果可见甜菜碱和 Triton X-100 组合的效果要明显优于和其他 2 种添加剂的组合,且 Triton X-100 的终浓度在 0.05% 和 0.15% 时效果比较理想。在 1.5 mol/L 甜菜碱 +0.15% Triton X-100 的基础上进一步分别加入 TMAC 和 DMSO(图 4B),可见加入 8 mmol/L 的 TMAC 和 1% 的 DMSO 的电泳条带比只有 2 种添加剂的效果有所提升,且二者条带亮度基本相同(PCR 产物均稀释 10 倍后上样)。



A :2 种添加剂组合　0 :TSS buffer + 1.5 mol/L betaine ;1 – 4 :在 0 基础上加入的 TMAC 浓度分别为 1、3、5、8 mmol/L ;5 – 8 :加入的 DMSO 浓度分别为 0.25%、1%、2.5%、3.5% ;9 – 12 :加入的 Triton X-100 浓度分别为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2% ;B :3 种添加剂组合　0 :TSS buffer + 1.5 mol/L betaine + 0.15 % Triton X – 100 ; 1 – 4 :在 0 基础上加入的 TMAC 浓度分别为 1、3、5、8 mmol/L ;5 – 8 :加入的 DMSO 浓度分别为 0.25%、1%、2.5%、3.5%

图 4　不同添加剂组合对于 PCR 扩增效果的影响

2.5　使用 Real-time PCR 比较 2 种 buffer

对以上 2 种效果较好的添加剂组合进行 Real-time PCR 反应比较二者的扩增效果。为使之易于区分,将其命名为 TBTT buffer 和 TBTD buffer,TBTT buffer 配方为 :TSS buffer + 1.5 mol/L betaine + 0.15% Triton X-100 + 8 mmol/L TMAC ;TBTD buffer 配方为 :TSS buffer + 1.5 mol/L betaine + 0.15% Triton X-100 + 1% DMSO。用这 2 种 buffer 扩增拷贝数为 1×10^8/μl 的质粒模板,并做复管,观察曲线质量,从图 5 中可见 TBTT buffer 和 TBTD buffer 总体效果相差不大,但 TBTT buffer 在扩增的荧光强度、曲线的重复性均要稍好于后者。

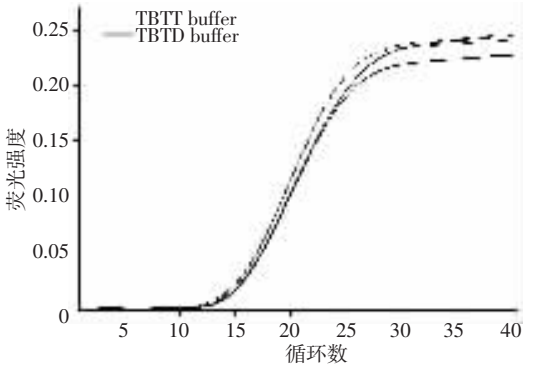
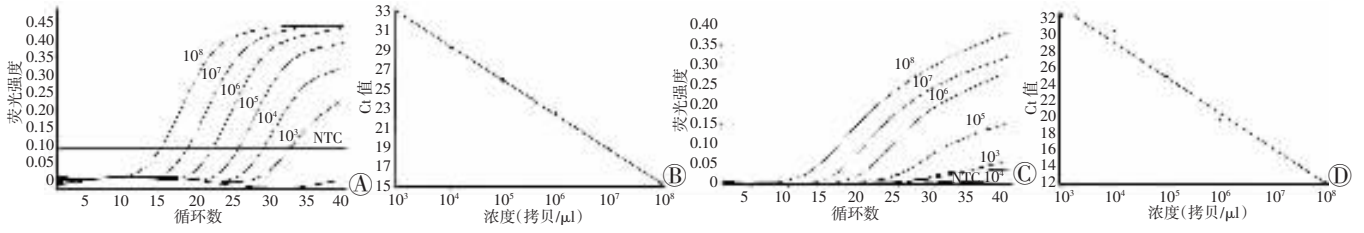


图 5　TBTT buffer 和 TBTD buffer 扩增效果的比较

2.6　Real-time PCR 标准曲线

使用最终选择的 TBTT buffer 对标准品即按 10 倍梯度稀释的p24质粒($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/μl)进行扩增并绘制出标准



A:使用 TBTT buffer 得到的扩增曲线;B:使用 TBTT buffer 制作的标准曲线;C:使用 TaKaRa buffer 得到的扩增曲线;D:使用 TaKaRa buffer 制作的标准曲线

图6 TBTT buffer 和 TaKaRa buffer 扩增曲线和标准曲线的对比

曲线,反应条件不变使用 TaKaRa 公司的 10×PCR buffer 进行比较对照(图6),可见使用 TBTT buffer 的扩增曲线在指数期增长明显,线性曲线呈标准 S 型,平台期明显,扩增效率和标准曲线相关系数均较好。TaKaRa buffer 扩增曲线平台期则不明显,扩增曲线显得较凌乱,标准曲线也不理想。

3 讨论

实时荧光定量 PCR *Taq*Man 探针法以其灵敏性、特异性和准确性,越来越多的应用在科研、临床及检验检疫等各个领域,相比基于 SYBR Green Ⅰ的荧光定量 PCR 法,*Taq*Man 探针法特异性更高[7]。早期 BDV 核酸检测主要通过 RT-PCR 方法,但是常规 PCR 不能准确定量,并且费时繁琐[8]。目前反转录后荧光定量 PCR 已经取代常规 RT-PCR 来检测定量血液或组织样本中的 BDV RNA,成为诊断 BDV 感染的一种重要方法。由于其简便、快速和不易出现 PCR 污染等特点,从而可以开发 BDV 荧光定量 PCR 诊断试剂盒对动物或人进行的大规模筛选,通过流行病调查来了解该病毒在我国的分布及流行特征,为防治将来可能出现大规模的暴发流行提供基础,此外在临床检验中可以进一步分析 BDV 和人类精神疾病的相关性。但是定量 PCR 不仅对实验操作的精确性要求很高,实验时各方面条件对实验结果的影响也非常大,这就决定了需要在反应条件上不断地进行优化。PCR 扩增缓冲液和 *Taq* 酶、引物和探针一样都能够明显影响 PCR 的效果[9],所以在开发 BDV 荧光定量 PCR 诊断试剂盒过程中,扩增缓冲液的优化是其中一个重要的环节。

我们首先选择了效果最佳的硫酸来滴定扩增缓冲液的 pH 值,由于 *Taq* 酶一般在 pH 值为 8 左右、温度为 72 ℃时的活性可以达到最大,在参考了 Sigma 的标准 PCR buffer 后在 pH 值上选择了滴定至 8.3[10]。在此基础上加入适合浓度的硫酸铵配制出 TSS buffer,硫酸铵通过增加反应液的离子浓度来促进 PCR 反应。由于我们不能准确预测哪些 PCR 添加剂适合扩增某种模板基因,所以需要通过一系列的尝试来判断,Ralser 等[11]曾针对一些高 GC 含量的基因设计出 PCR 添加剂的组合,从而很大程度上提高了 PCR 的产量。Triton X-100、DMSO、TMAC 和甜菜碱都是常见的 PCR 添加剂,原理大多通过提高 DNA 聚合酶的稳定性或降低模板 DNA 的二级结构等机制来促进对目的片段的扩增。对于所要检测的 p24 模板,我们通过常规 PCR 首先确定了这几种添加剂各自的效率和最佳工作浓度,并尝试将这些添加剂进行不同的组合进行优化。在实验中发现甜菜碱对 PCR 的增强较明显,而且浓度的变化对于 PCR 的结果影响相对较小,故使用一个效果较好的甜菜碱浓度去和其他添加剂的几个浓度分别组合进行依次对比,最终得到效果最好的组合 TBTT buffer。DMSO 虽然可以降低引物的退火温度,但对 *Taq* 酶的活性有一定影响[12],这可能是 TBTT buffer 在荧光强度和 Ct 值上稍好于 TBTD buffer 的原因。

在常规 PCR 中通过优化证明了使用几种添加剂后可以明显提高 PCR 的扩增效率,而在 Real-time PCR 反应中使用 TBTT buffer 后可见扩增曲线指数期扩增明显,标准曲线良好,根据软件计算出相关系数(R^2)=0.99989,标准曲线斜率为 -3.508,扩增效率(E)=93%,相关系数超过了 0.99,表明标准曲线 Ct 值和 DNA 起始拷贝数的线性关系良好,定量可信度高,同时扩增效率也达到了 90% 以上。在相同条件下将 TTBT buffer 和 TaKaRa PCR buffer 的比较中可以看出 TTBT buffer 在扩增 p24 基因上效果还是明显优于后者,可见虽然引物设计的好坏是影响荧光定量 PCR 扩增效率的主要因素[13],但是对于相同的模板基因,PCR buffer 的不同对于 PCR 反应的扩增效率和定量的准确性也有着很大的影响。此外值得注意的是,构建 buffer 的这些成分包括一些 PCR 添加剂的成本都不高,不论在效果上还是在经济上都可以达到试剂盒的需求,为顺利开发出博尔纳病病毒 Real-time PCR 诊断试剂盒奠定了坚实的基础。

参考文献:

[1] Bode L, Ludwig H. Borna disease virus infection, a human mental-health risk[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3):534-545.

[2] 徐平,谢鹏,邹德智. 病毒性脑炎患者 Borna 病病毒 P24 基因片段的检测[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(5):309-312.

[3] 王振海，谢鹏，韩玉霞，等. 宁夏及其周边地区博尔纳病病毒感染的分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志，2006，27(6)：479－482.
[4] 朱丹，张英英，展群岭，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2093，2105.
[5] Iwata Y，Takahashi K，Peng X，*et al*. Detection and sequence analysis of borna disease virus p24 RNA from peripheral blood mononuclear cells of patients with mood disorders or schizophrenia and of blood donors[J]. J Virol，1998，72(12)：10044－10049.
[6] Schindler A R，Vogtlin A，Hilbe M，*et al*. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts [J]. Mol Cell Probes，2007，21 (1)：47－55.
[7] Song C，Zhu C，Zhang C，*et al*. Detection of porcine parvovirus using a taqman-based real-time pcr with primers and probe designed for the NS1 gene[J]. Virol J，2010，7(1)：353.
[8] 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.
[9] Wolffs P，Grage H，Hagberg O，*et al*. Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR[J]. J Clin Microbiol，2004，42(1)：408－411.
[10] Ahmad A，Ghasemi J. New buffers to improve the quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2007，71(8)：1970－1978.
[11] Ralser M，Querfurth R，Warnatz H J，*et al*. An efficient and economic enhancer mix for PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun，2006，347(3)：747－751.
[12] Hung T，Mak K，Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction[J]. Nucleic Acids Res，1990，18(16)：4953.
[13] Bustin S A，Benes V，Garson J A，*et al*. The MIQE guidelines：minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clin Chem，2009，55(4)：611－622.

（收稿：2010-11-22 修回：2011-01-02）
（编辑 张 维）

文章编号：1000-5404(2011)13-1327-01

个案与短篇

通脉糖眼明胶囊对糖尿病视网膜病变患者血管内皮生长因子水平的影响

徐寒松[1]，孔德明[1]，向 慧[2]（550003 贵阳，贵阳中医学院第二附属医院内分泌科[1]；550002 贵阳，贵州省人民医院心理科[2]）

【关键词】 通脉糖眼明胶囊；糖尿病视网膜病变；血管内皮生长因子
【中图法分类号】 R285.6 【文献标志码】 B

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy，DR)是糖尿病常见的微血管并发症，是糖尿病患者致盲的主要原因之一，多项研究表明，血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)在 DR 的发生、发展中起重要作用[1]，血浆 VEGF 增高可通过多种途径破坏血-视网膜屏障，导致视网膜微血管通透性增高、渗出增加及视网膜水肿，进一步刺激视网膜内皮细胞增殖，最终导致视网膜新生血管形成及纤维增生，促进视网膜病变发生、发展。我们前期研究采用通脉糖眼明胶囊对 DR 进行防治，疗效显著[2]。本研究旨在通过观察通脉糖眼明胶囊对 DR 患者 VEGF 水平影响，探讨通脉糖眼明胶囊治疗 DR 的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2010 年 1 月至 2010 年 12 月住院的 DR 患者 68 例，男性 28 例，女性 40 例，年龄 39～61(46.0±4.8)岁，病程(5.8±1.6)年。糖尿病诊断符合 1999 年 WHO 制定的标准，DR 诊断符合 1985 年中华医学会眼科分会制定的标准，Ⅰ期 20 例，Ⅱ期 38 例，Ⅲ期 10 例；将患者分为通脉糖眼明胶囊治疗组 36 例，对照组 32 例，两组患者性别、年龄、糖尿病病程、视网膜病变程度等具有可比性($P>0.05$)。两组均在严格饮食和运动治疗的基础上，给予胰岛素治疗使血糖控制达标后纳入实验，同时通脉糖眼明胶囊治疗组给予通脉糖眼明胶囊(贵阳中医学院第二附属医院药物制剂室提供。250 mg/粒。批号：090124)口服，每次 750 mg，3 次/d，共治疗 8 周。对照组给予常规控制血糖及改善微循环治疗。另择体检健康者 30 例为正常组，男性 12 例，女性 18 例，年龄 39～58 (47.0±3.9)岁。3 组年龄、性别、血压、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)比较无统计学差异($P>0.05$)；通脉糖眼明胶囊治疗组和对照组患者糖尿病病程、视网膜病变程度、治疗前后糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹血糖(FBG)水平比较无统计学差异($P>0.05$)。

本试验经医院伦理委员会批准，患者已经签署知情同意书。

1.2 方法

3 组分别于治疗前后经禁食 8～12 h 于次日空腹抽静脉血检测 VEGF、FBG、HbA1c、TC、TG。采用酶联免疫吸附试验法检测 VEGF，试剂盒购自 R&D 公司，按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组均数间比较行方差分析。

2 结果

68 例 DR 患者治疗前 VEGF 水平[治疗组(182.6±26.5)μg/L，对照组(179.3±25.2)μg/L]与正常组[(67.9±12.6)μg/L]比较显著升高($P<0.01$)；治疗 8 周后 VEGF 水平较治疗前下降($P<0.01$)；其中治疗组 VEGF 水平[(116.4±21.39)μg/L]下降尤为显著，与对照组[(137.5±24.7)μg/L]相比差异显著($P<0.01$)。

(下转 1332 页)

【通信作者】 徐寒松，E-mail：xuhansong911@163.com