论著

文章编号:1000-5404(2013)14-1480-05

壳聚糖/多壁碳纳米管复合膜诱导羟基磷灰石仿生合成的研究

杨 俊[1,2],陈治清[3],胡常红[1,2] (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院修复科[1];401147 重庆,口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室[2];610041 成都,四川大学华西口腔医学院材料学教研室[3])

[摘要] **目的** 制备壳聚糖/多壁碳纳米管复合膜作为骨引导再生膜,诱导羟基磷灰石仿生合成,研究低浓度多壁碳纳米管对复合膜仿生矿化的影响。**方法** 壳聚糖/多壁碳纳米管复合膜在仿生溶液中仿生矿化,并用傅氏转换红外线光谱分析仪(FTIR)、扫描电镜(SEM)、X射线衍射(XRD)对复合膜表面的形态和结构进行表征,同时将复合膜分别与血清蛋白和大鼠骨髓基质干细胞培养。**结果** 壳聚糖/多壁碳纳米管复合膜表面矿化生成纳米羟基磷灰石,并且多壁碳纳米管的分散程度影响羟基磷灰石晶体的体积。当多壁碳纳米管的浓度为1%(质量分数)时,羟基磷灰石晶体的体积最小,约9.6 nm。多壁碳纳米管能够促进复合膜吸附蛋白($P<0.05$),并且在实验早期(<2 h),1%浓度吸附量最高。同时,碳管的添加能够促进大鼠骨髓基质干细胞增殖,1%浓度最为显著($P<0.05$)。**结论** 壳聚糖/多壁碳纳米管复合膜具有促进骨形成的潜力。

[关键词] 壳聚糖;多壁碳纳米管;纳米羟基磷灰石

[中图法分类号] R318.08;R322.41;R322.71 [文献标志码] A

Biomimetic synthesis of nanoscopic hydroxyapatite induced by chitosan/multiwall carbon nanotube composites

Yang Jun[1,2], Chen Zhiqing[3], Hu Changhong[1,2] ([1]Department of Prosthodontics, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015; [2]Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing, 401147; [3]Department of Materials Science, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] Objective To determine the osteogenic potential of the chitosan/multiwall carbon nanotube (CS/MWNTs) composites. Methods Calcium phosphate coated on the surface of CS/MWNTs composites was induced through simulated body fluid. Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and X-ray diffraction were used to determine its characteristics. The membranes were cultured with bovine serum protein solution and rat bone marrow stromal stem cells. Results Nanoscopic hydroxyapatite was formed on the CS/MWNTs composites at low MWNTs concentrations, and the dispersion of the multiwall carbon nanotube affected the crystallite size of the nanoscopic hydroxyapatite, with the smallest size of 9.6 nm at a mass percentage of 1.0%. The composites adsorbed serum proteins, and promoted cells proliferation, with best effect at mass percentage of 1.0% ($P<0.05$). Conclusion The CS/MWNT composites have the osteogenic potential.

[**Key words**] chitosan; multiwall carbon nanotube; nanoscopic hydroxyapatite

Supported by the Starting Foundation for Doctorial Degree of Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University (11-009). Corresponding author: Hu Changhong, Tel: 86-23-89035721, E-mail: eyjjjyy@sina.com

牙槽骨的再生一直是全世界牙医面临的难题。引导骨组织再生(guided bone tissue regeneration, GBR)是解决这一难题的办法之一。理想的GBR膜不但有良好的机械性能,还要能够引导骨组织的再生[1-2]。碳纳米管(carbon nanotube, CNT)自从1991年问世以来得到了人们的广泛研究。CNT具有一维纳米结构、高比表面积,是一种理想的机械增强材料,能够提高复合物的机械性能。碳纳米管具有生物活性,许多体外实验证实多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWNTs)能够促进成骨细胞的黏附和增殖[3]。例如Supronowicz制备不同浓度左旋聚乳酸/多壁碳纳米管(PLLA/MWNTs)纳米复合材料(MWNTs浓度10%、15%、20%质量分数),接种成骨细胞后,加以电流刺激,发现成骨细胞增殖能力增加,细胞外钙沉积增

[基金项目] 重庆医科大学附属口腔医院博士启动基金(11-009)

[通信作者] 胡常红,电话:(023)89035721,E-mail: eyjjjyy@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130201.1715.001.html(2013-02-01)

多[4]。MWNTs在基体中保持分散状态能够增加其与基体的结合强度,提高复合材料的机械性能[5]。Wang等[6]和Tang等[7]都认为0.8%(质量分数)是MWNTs在壳聚糖基体中保持分散状态的最大浓度,并且复合材料壳聚糖/MWNTs的拉伸强度最大。MWNTs在基体中的分散浓度较低。本实验以壳聚糖/多壁碳纳米管(CS/MWNTs)薄膜为模板,研究具有机械增强作用的低浓度MWNTs对复合材料成骨活性的影响,探讨MWNTs浓度与材料成骨能力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

CS(脱乙酰度85%,相对分子质量20×10^4)购于浙江金壳生物化学有限公司;MWNTs纯度>95%,半径10~30 nm,长度5~15 μm,购于深圳纳米技术有限公司;4周龄的Sprague-Dawley(SD)大鼠,由四川大学华西医学实验动物中心提供,二级。

1.2 制备壳聚糖/MWNTs复合膜(CM膜)

将MWNTs放入浓硝酸中,煮沸2 h,过滤后用去离子水洗涤至中性,干燥备用。用2%(体积分数)冰乙酸溶解壳聚糖(CS),取MWNTs溶于去离子水,超声分散得MWNTs悬浊液;将CS溶液倒入MWNTs溶液得混合液调整CS浓度为2%(质量分数),磁力搅拌后超声去泡,倒入玻璃盒,50℃干燥成膜。浸泡在10%(质量分数)NaOH溶液中揭膜,去离子水冲洗后晾干,厚度约0.1 mm,备用。根据MWNTs的含量分别为0.004 g(0.4%)、0.008 g(0.8%)、0.010 g(1.0%)、0.014 g(1.4%)和0.04 g(4.0%)(质量分数),将实验组分成CM04、CM08、CM10、CM14和CM40 5组,CS组作为空白对照组。

1.3 纳米羟基磷灰石(nHA)-壳聚糖/MWNTs复合膜(HCM膜)的制备

在37 ℃条件下,将膜置入0.1 mol/L $Ca(NO_3)_2$缓冲液中浸泡12 h,去离子水冲洗后,再次置入0.1 mol/L Na_3PO_4缓冲液中浸泡12 h。浸泡过程反复9次,将膜取出,去离子水冲洗后晾干备用。实验分组为HCM0、HCM04、HCM08、HCM10、HCM14、HCM40。

1.4 表征

利用扫描电镜(SEM,JSM-5900LV. JEOL,Japan)观察CM膜的断面和HCM膜的表面。利用傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR,NICOLET-560. Nicolet,USA)采集MWNTs、CS膜和HCM膜的FTIR图谱。利用X射线衍射仪(DX-1000 CSC,Fangyuan,China)对HCM膜做物相分析。

1.5 蛋白吸收

材料剪裁成0.5 cm×0.5 cm方块,75%酒精浸泡消毒,放入1 mL PE试管中,每管加入含2.5%胎牛血清的PBS液,每组3个管。样本管和空白对照管一起放入37 ℃,5% CO_2孵箱中培育2、12、24 h后取出。用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测每管溶液中蛋白的浓度。测得溶液的光密度值即可计算溶液中的蛋白浓度,根据公式$C_{材}=C_0-C_{液}$($C_{材}$:材料吸附的蛋白量;C_0:空白管中血清中的蛋白量;$C_{液}$:实验管中血清的蛋白量)计算复合膜吸附的血清蛋白。

1.6 大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)培养及MTT测试

4周龄雄性SD大鼠处死后分离股骨和胫骨,剪去骨骺端,用培养基冲出骨髓并吹散,收集离心所获细胞制成细胞悬液,再次分离所得细胞即为原代BMSCs,细胞按$1\times10^5/cm^2$密度接种,37 ℃、5% CO_2孵箱静置培养。每2天换液1次。当细胞在培养瓶壁上逐渐铺满达到80%时,消化终止细胞生长,收集消化所得的细胞按$1\times10^5/cm^2$接种培养瓶。收集第3代BMSCs细胞备用。

材料剪裁成1 cm×1 cm的方块,75%酒精消毒,放入6孔板中,每孔接种1 mL细胞悬液(密度5×10^5/mL),置入孵箱(37 ℃,5% CO_2)中培养。在预定时间点,从孵箱中取出6孔板,做MTT测试,每组4个样本。MTT与细胞线粒体中的呼吸链反应,在细胞色素C和琥珀酸脱氢酶的作用下生成蓝色Formazan结晶,将Formazan结晶溶解于二甲基亚砜生成紫色的溶液,读取溶液的光密度值就能够间接反映活细胞数目。

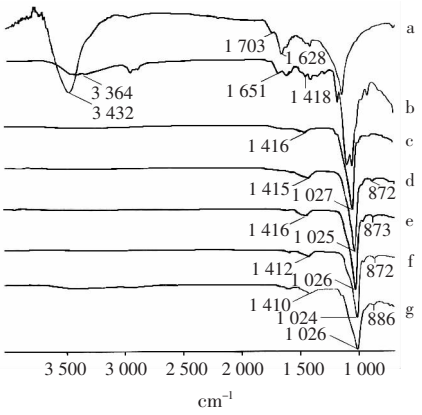
1.7 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件,取95%的置信区间($P<0.05$),采用单因素方差分析确定各组间的显著性差异。

2 结果

2.1 FTIR测试结果

如图1所示,CS在3 364 cm^{-1}处出现伯氨基和羟基的特征峰,在1 651 cm^{-1}处出现羰基的收缩振动峰,这些峰在HCM中都消失不见。CS在1 418 cm^{-1}出现仲氨基的振动峰,在HCM中移到1 410~1 416 cm^{-1}处。MWNTs经酸处理后,在3 432 cm^{-1}处出现羟基的收缩振动峰,在1 628、1 703 cm^{-1}处出现羧基的收缩振动峰,说明MWNTs经酸处理后在表面接枝了羟基和羧基。而在HCM的FTIR图谱中,该处振动峰消失,在1 024~1 027 cm^{-1}处出现P基团的收缩振动峰。



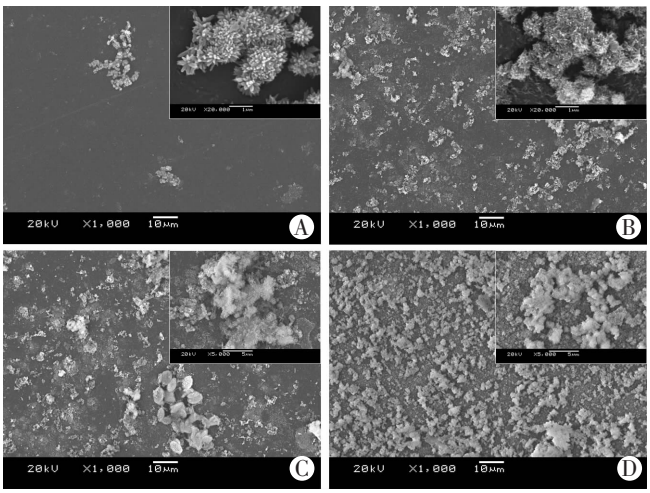
a:MWNTs;b:CS;c:HCM04;d:HCM08;e:HCM10;f:HCM14;g:HCM40

图1 FTIR图谱

2.2 nHA在CM复合膜表面原位合成

如图2所示,将CM10膜在$Ca(NO_3)_2$-Na_3PO_4缓冲液中矿化1个周期时,膜表面仅有零星nHA生成,呈长梭状簇拥成花蕾样。随着矿化周期延长,膜表面的nHA分布逐渐密集,呈层

状叠加生长,在矿化5个周期时,出现粗大的珊瑚状晶体簇,在矿化9个周期后,HCM10表面密布花蕾状晶体簇。



A:1次;B:3次;C:5次;D:9次

图2 不同矿化周期的HCM10表面SEM图像

2.3 XRD测试结果

如图3所示,HCM膜在2θ=26°(002)的特征峰尖锐粗大,随着MWNTs的浓度逐渐增多,2θ=31.8°(211)、2θ=32.9°(112)和2θ=39.8°(310)处的特征峰逐渐增大,但是当浓度达到4%时,2θ=31.8°(211)和2θ=32.9°(112)处的特征峰强度减小,2θ=39.8°(310)处的特征峰消失。当MWNTs的浓度为0.4%、0.8%时,在28°出现衍射峰,但是当MWNTs浓度增加后,该处峰消失。

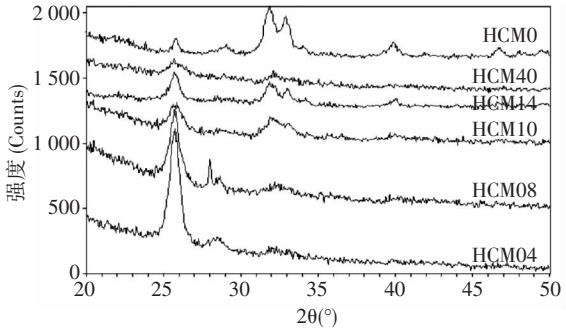


图3 不同浓度HCM的XRD图谱

2.4 MWNTs在CM膜中的分散

图4显示CM10和CM40横截面的扫描电镜图像,散布的白色亮点是MWNTs的断端。1.0%(质量分数)低浓度MWNTs在CS基体中分散良好;但是4.0%(质量分数)高浓度MWNTs在CS基体中部分团聚。

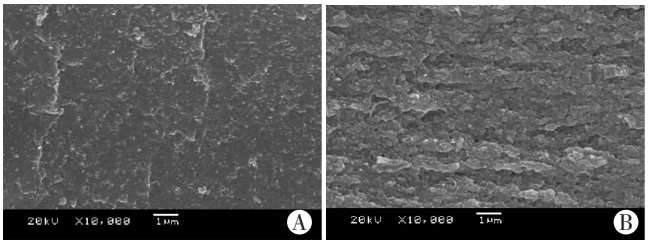
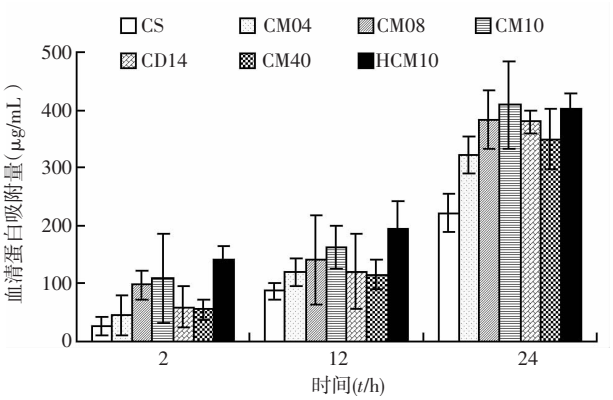


图4 CM10(A)和CM40(B)横截面SEM图像

2.5 CS、CM、HCM10复合膜吸附血清蛋白

如图5所示,样本在胎牛血清中浸泡的时间增加,蛋白吸附量明显增多。当浸泡时间为2 h时,CM08、CM10组及HCM10组蛋白吸附量高于CS组($P<0.05$),这3组蛋白吸附量无显著差异($P>0.05$);浸泡时间为12 h时,HCM10组蛋白吸附量较CS对照组显著增加($P<0.05$),当浸泡时间达到24 h时,各组CM和HCM10组均超过CS对照组($P<0.05$),但是CM组与HCM10组无明显差异($P>0.05$)。

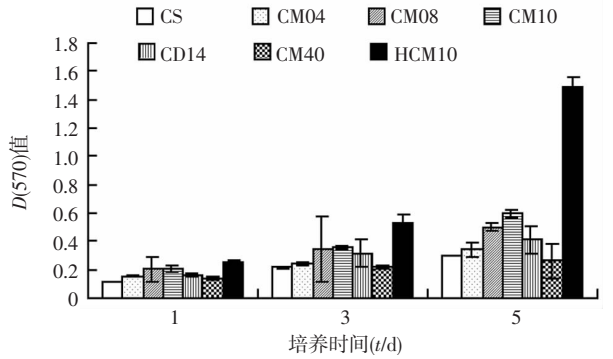


a:$P<0.05$,与CS组比较

图5 CS、CM、HCM10在胎牛血清溶液中浸泡不同时间表面吸附的血清蛋白量

2.6 大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)的MTT测试

BMSCs分别接种在CS、CM、HCM10复合膜表面,在第1、3、5天进行MTT分析。如图6所示,以CS组作为空白对照组,CM10和HCM10组BMSCs细胞均表现出很强的增殖活性($P<0.05$);而CM40表面的BMSCs细胞增殖活性最弱。但是,当MWNTs浓度高于1%(质量分数)时,这种细胞增殖活性增加的现象变弱。细胞增殖实验结果表明,CM10复合膜组BMSCs细胞的增殖活性最好($P<0.05$)。从图中可以观察到,在第1、3、5天时,HCM10组的值比CM10组的值要高,尤其在第5天,远远高出其余各组($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与CS组比较

图6 BMSCs接种在CS、CM、HCM10表面上培养不同时间增殖的情况

3 讨论

3.1 纳米羟基磷灰石(nHA)仿生矿化

本研究显示,CS表面携带伯氨基、羟基、羰基,酸化MWNTs表面携带羟基、羧基,HCM表面没有上述基

团,但是有P基团,说明Ca^{2+}不但与MWNTs携带的羟基和羧基接合,还和CS上的氨基、羟基和羰基结合,同时,P基团也与氨基发生结合。从图1中可见,CS功能基团的振动峰强度小于MWNTs功能基团振动峰的强度。这提示MWNTs表面的功能基团-羟基和羧基,在nHA成核生长的过程中所起的作用更大。同时,CS和MWNTs的特征振动峰在HCM图谱中的消失也提示二者之间产生了化学连接。另外,在HCM的FTIR图谱中,可以看到CO_3^{2-}的振动峰出现在872~886 cm^{-1}的位置,表明nHA中有CO_3^{2-}存在。

一般来说,组织钙化过程中晶体矿化从异构成核开始[8-9]。CM膜交替浸泡于$Ca(NO_3)_2$-Na_3PO_4缓冲液后,表面能够形成nHA是依赖CM表面的功能基团:MWNTs携带的羟基和羧基,CS表面的氨基、羟基和羰基。因此,nHA在CM膜表面原位异构成核和生长。首先,CS表面的氨基、羟基和羰基,与MWNTs表面的羟基和羧基一起吸引钙溶液中的Ca^{2+},使膜表面Ca^{2+}浓度增大,Ca^{2+}通过静电作用与阴离子结合,同样,CM膜表面的Ca^{2+}和氨基吸引磷溶液中的PO_4^{3-},使膜表面溶液中PO_4^{3-}浓度增大,PO_4^{3-}与膜表面的阳离子结合,nHA晶核形成。接着,nHA晶核吸附结合溶液中的Ca^{2+}和PO_4^{3-},形成nHA晶体,nHA晶体吸附结合溶液中的Ca^{2+}和PO_4^{3-},晶体逐渐长大。以上两步反复进行,膜表面的nHA晶体增多长大。如图2所示,CM10复合膜在矿化液中浸泡1个周期,表面有nHA生成,随着浸泡周期增加,表面的晶体增多,当矿化9个周期后,针状nHA呈簇聚集,覆盖整个CM10复合膜表面,提示早期矿化的nHA也能提供成核位点。

3.2 MWNTs浓度与nHA的关系

HA有两组特征衍射峰,分别在2θ=26°(002),2θ=31.8°(211)到2θ=32.9°(112)和39.8°(310)[10-11]。本研究显示,随着MWNTs的添加,nHA最强峰的位置从31.8°和32.9°移到26°。说明低浓度MWNTs能使复合材料表面合成的nHA的方向择优取向到c轴[12-13]。根据图3,利用Scherrer's公式用(002)特征峰宽计算nHA晶体的平均大小L。$L = K\lambda/(\beta\cos\theta)$,其中K:谢乐常数;λ:X射线波长0.154 056 nm;β:衍射峰的半高宽;θ:衍射角。nHA的平均尺寸从22.2 nm减小到9.6 nm,当浓度为1%(质量分数)时,尺寸最小为9.6 nm。当MWNTs的添加量超过1%(质量分数)后,nHA的平均尺寸增加。相比壳聚糖/明胶薄膜,其表面矿化生成的nHA的大小为32.3~17.2 nm,用低浓度MWNTs可以更容易地控制nHA晶体的大小[14]。

图4显示1.0%低浓度MWNTs在CS基体中能够保持良好的分散。但有研究认为0.8%是MWNTs在CS中分散的最大浓度[6-7]。本结果显示nHA晶体尺寸与MWNTs的分散状态有关。随着呈分散状态MWNTs的浓度增大(如0.4%、0.8%和1.0%),nHA的晶体尺寸逐渐减小。这是因为分散的MWNTs增多,材料表面能够和Ca^{2+}结合的羧基和羟基增多,nHA的成核位点增加,晶核增多,晶体变小。当MWNTs浓度增大发生团聚后(如1.4%和4.0%),能够和Ca^{2+}结合的羧基和羟基浓度减少,nHA成核位点减少,晶体体积增大。当MWNTs浓度为1.0%时,nHA的体积最小,约9.6 nm。这个现象提示MWNTs表面的羟基和羧基在nHA形成过程中起重要作用。

3.3 CM复合膜吸附血清蛋白、促进BMSCs细胞增殖

复合膜在接触血清的早期(<2 h),复合膜蛋白吸附能力与MWNTs浓度有关,复合膜表面分散的MWNTs越多,复合膜吸附血清蛋白的能力越大,CM10组蛋白吸附量最高($P<0.05$)。当复合膜在血清溶液中浸泡的时间过长(24 h)时,添加MWNTs能够提高复合膜的蛋白吸附能力,但是MWNTs的浓度与蛋白吸附能力没有明显关系。在CS中添加MWNTs能促进BMSCs细胞增殖,CM矿化后,BMSCs细胞增殖活性比非矿化组更强,这是因为HCM10复合膜表面覆盖的纳米羟基磷灰石本身具有成骨诱导能力,能够促进BMSCs细胞增殖。

本实验中,用交替矿化法在CS/MWNTs复合膜表面仿生矿化合成nHA,制备一种新型的GTR膜。酸处理后的MWNTs表面携带羟基和羧基,与CS表面的氨基、羟基和羰基一起与缓冲液中的Ca^{2+}和PO_4^{3-}结合,为nHA提供成核位点。MWNTs的含量能够影响nHA晶体的成核与生长。当分散的MWNTs增加时,nHA晶体减小,当MWNTs浓度为1%时,晶体体积最小为9.6 nm;当MWNTs浓度增大团聚增多后,nHA体积变大。CS/MWNTs复合膜能够吸附胎牛血清蛋白,促进BMSCs细胞的增殖,1%浓度最佳。

参考文献:

[1] Tonelli F M, Santos A K, Gomes K N, *et al*. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 4511-4529.

[2] Hong H, Wei J, Liu C. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration[J]. Compos Part B-Eng, 2007, 38(3): 311-316.

[3] Venkatesan J, Kim S K. Stimulation of minerals by carbon nanotube grafted glucosamine in mouse mesenchymal stem cells for bone tissue engineering[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012, 8(4): 676-685.

[4] Supronowicz P R, Ajayan P M, Ullmann K R, *et al*. Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59(3): 499-506.

[5] Pan H, Zhang Y, Hang Y, *et al*. Significantly reinforced composite fibers electrospun from silk fibroin/carbon nanotube aqueous solutions [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(9): 2859 – 2867.
[6] Wang S F, Shen L, Zhang W D, *et al*. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(6): 3067 – 3072.
[7] Tang C, Xiang L, Su J, *et al*. Largely improved tensile properties of chitosan film *via* unique synergistic reinforcing effect of carbon nanotube and clay[J]. J Phys Chem B, 2008, 112(13): 3876 – 3881.
[8] Jakobsen R J, Brown L L, Hutson T B, *et al*. Intermolecular interactions in collagen self-assembly as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Science, 1983, 220(4603): 1288 – 1290.
[9] Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport[J]. Conn Tissue Res, 1995, 33(1/3): 163 – 170.
[10] Ahn E S, Gleason N J, Nakahira A, *et al*. Nanostructure processing of hydroxyapatite-based bioceramics[J]. Nano Lett, 2001, 1(3): 149 – 153.
[11] Koumoulidis G C, Katsoulidis A P, Ladavos A K, *et al*. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route[J]. J Colloid Interface Sci, 2003, 259(2): 254 – 260.
[12] Liu Q, de-Wijn J R, van-Blitterswijk C A. Nano-apatite/polymer composites: mechanical and physicochemical characteristics[J]. Biomaterials, 1997, 18(19): 1263 – 1270.
[13] Hartgerink J D, Beniash E, Stupp S I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers [J]. Science, 2001, 294 (5547): 1684 – 1688.
[14] Li J, Chen Y, Yin Y, *et al*. Modulation of nano-hydroxyapatite size *via* formation on chitosan-gelatin network film *in situ*[J]. Biomaterials, 2007, 28(5): 781 – 790.

（收稿:2012-11-17;修回:2013-01-09）
（编辑 张 维）

（上接1479页）

2.3 治疗及转归

263例患儿中有207例用更昔洛韦治疗,56例用α-干扰素治疗。并发肝功损害者加用保肝治疗;并发心肌损害者加用营养心肌治疗;肝脾大者密切观察,经治疗后均渐缩小,无1例发生脾破裂;全部病例临床治愈出院,无重症、死亡病例。

3 讨论

IM主要发生于儿童和青少年。本组患儿发病年龄集中在1~6岁,与国内报道好发于学龄前期一致[3]。IM典型临床表现有不规则发热、咽峡炎、浅表淋巴结肿大,外周血淋巴细胞增多并有异形淋巴细胞[4-5]。本结果显示不同年龄段发生IM的主要临床症状有差异,婴幼儿以发热较常见,学龄前期儿童咽峡炎、扁桃体炎症状明显,可能与学龄前为扁桃体发育高峰期有关。学龄前及学龄期儿童淋巴结肿大患儿亦较婴幼儿期为多。

既往以外周血异形淋巴细胞≥10%作为诊断指标之一。本组患儿外周血异形淋巴细胞≥10%占89.73%,以10%~40%多见。本研究发现异形淋巴细胞百分比的增高程度与肝功能异常发生率、肝肿大发生率、EB-VCA-IgM阳性率呈正相关($P<0.01$)。提示异形淋巴细胞增高程度可作为判断IM病情严重程度的间接指标。异形淋巴细胞百分比增高的患儿需密切关注肝功能损害情况,及时加用保肝药物,防止肝脏进一步损害,避免危及生命的情况发生。由于其他病毒如巨细胞病毒、人乳头状病毒、呼吸道合胞病毒等感染,也可引起异形淋巴细胞增高,故此项检查的特异性不高[4]。研究[6-8]显示:针对EB病毒壳抗原(EB-VCA)或者EB病毒核心抗原(EVNA)的抗体检测是一种诊断IM最敏感且高度特异的方法,EBV-VCA-IgM阳性是IM早期、敏感、特异的临床诊断依据。EBV-VCA-IgM在急性期出现,可维持4~8周,EBV-VCA-IgG可持续终生。本组病例中EBV-VCA-IgM阳性率为61.60%,其中部分病例异形淋巴细胞百分比虽未达到10%,但有典型的发热、肝脾肿大、淋巴结肿大等IM临床特点。因此,对IM而言,EBV-VCA-IgM的诊断价值大于异形淋巴细胞。还有部分病例IM症状典型,但EBV-VCA-IgM为阴性,分析其可能与EBV-VCA-IgM在个别病例中产生延迟有关。由于EB病毒感染的血清学反应复杂多样,有的持续缺失或长时间存在,给IM的确诊带来困难。近年来提出抗体亲合力检测,用以判断是否急性期感染[2]。根据EBV感染期间产生抗体的不同动力学特点,同时检测患者血清4种抗EBV抗体(抗CA-IgG/IgM、抗EA-IgG、抗NA-IgG)和抗CA-IgG亲合力可提高诊断原发性EBV感染的敏感性[2]。

综上所述,IM临床表现多样,首发症状不一,典型病例诊断不难,但对于不典型病例如不及时进行特异性检查,容易造成漏诊、误诊。因此,在工作中若发现以下情况需提高警惕[9]:①发热持续时间长,超过1周者;②咽峡炎伴咽部有灰白色分泌物附着并迅速消失;③颈部淋巴结肿大,抗感染治疗无效者;④鼻塞、眼睑水肿,除外相关性疾病;⑤外周血白细胞总数正常或减低,以淋巴分类为主;⑥外周血白细胞总数升高,初起以中性粒细胞分类为主,复查后以淋巴分类为主。出现以上任一情况时均应提高警惕,并尽早行异形淋巴细胞检查及EBV-VCA-IgM检查,有条件者同时行抗CA-IgG亲合力检查,早期明确诊断,早期治疗,可提高IM治愈率,避免漏诊及误诊而引发不良后果。

参考文献:

[1] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 824.
[2] 谢正德. 儿童EB病毒传染性单核细胞增多症临床特征及诊断标准[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22 (22): 1759 – 1760.
[3] 吕洁, 金莲花, 孙景辉, 等. 儿童传染性单核细胞增多症临床特点与发病年龄的关系: 附312例分析[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29 (6): 518 – 521.
[4] 覃肇源, 李剑波, 刘美娜. 儿童传染性单核细胞增多症诊断和治疗新进展[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(9): 1476 – 1477.
[5] 王晓莉, 于洁, 徐西华, 等. 传染性单核细胞增多症及其相关疾病临床特点分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2006, 21(9): 696 – 698.
[6] Cheng C C, Chang L Y, Shao P L, *et al*. Clinical manifestations and quantitative analysis of virus load in Taiwanese children with Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2007, 40(3): 216 – 221.
[7] Siennicka J, Trzcinska A. Laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infection[J]. Med Dosw Mikrobiol, 2007, 59(3): 259 – 266.
[8] Nystad T W, Myrmel H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis[J]. J Clin Virol, 2007, 38(4): 292 – 297.
[9] 陈安玲. 传染性单核细胞增多症误诊的临床分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(5): 593.

（收稿:2013-03-20;修回:2013-04-19）
（编辑 黄 超）