维普资讯 http://www.cqvip.com

脑脊液髓鞘碱性蛋白片段的酶联免疫测定及其临床意义

神经病学研究所 向 敬 董为伟 吴渝宪

提 要 从牛脊髓髓鞘碱性蛋白(MBP)分离出三种MBP片段，建立了脑脊液MBP片段的酶联免疫检测法。初步临床研究表明，脑脊液MBP片段P1有重要的临床意义，与完整MBP相比，其诊断灵敏度明显提高，更能反映多发性硬化的脱髓鞘活动及临床病情

关键词 髓鞘碱性蛋白；髓鞘碱性蛋白片段；脑脊液；酶联免疫测定法
中图分类号 R446.61；R446.14

脑脊液（CSF）MBP是目前反映中枢神经髓鞘损害最好的实验室指标之一[1]，Gupta(1988)应用放射免疫法（RIA）检测CSF中的完整MBP和MBP片段[1]，发现MBP片段的临床价值较完整MBP的大[1]。我们曾应用酶联免疫法(ELISA)检测出CSF的游离型和结合型MBP[2]。鉴于迄今尚未见关于CSF MBP片段的ELISA检测法的报道。本研究旨在建立CSF MBP片段的ELISA检测法，并探讨其临床意义。

资料和方法

1. 检测对象 共检测84例不同神经疾病患者，其中多发性硬化（MS）34例。所有MS患者的诊断均符合McAlpine(1972)[3]拟定的诊断标准，病情的严重程度按Millar氏评分标准进行评分[3]。按Warren关于MS的分类标准，34例中恶化型14例，进展型12例，稳定型6例，好转型2例。其他神经疾病组30例。20例对照组患者神经系统检测均无阳性发现，CSF常规生化亦正常。所有受试者的CSF标本均取自腰池穿刺，并在−20℃保存。

2. 测定方法

（1）MBP片段的制备 按以前报道的方法从牛脊髓中提取和纯化MBP[2]。取200mg MBP和1.0mg胃蛋白酶溶于42ml醋酸氨溶液中（浓度0.05 M，pH3.4），将上述溶液置于振荡仪中振荡孵育100分钟（25℃），然后冻干，再溶于碳酸铵溶液中在3×20 cm层析柱上以羧甲基-纤维素（CM Cellulose）为填料层析，经用梯度氯化钠溶液洗脱，分离出三种主要的MBP片段，分别命名为MBP-P1，MBP-P2和MBP-P3（如图1所示）。收集洗脱液主峰，置于0.5%醋酸溶液中脱盐。脱盐后的MBP片段冰冻（−20℃）保存。

（2）抗血清的制备 按以前报道的方法制备免抗牛MBP抗血清[2]。

（3）MBP的测定 参照以前报道的方法进行[2]，本研究的抗原抗体结合孵育时间为6小时。

（4）MBP片段的测定 抗血清选用抗MBP抗血清，以MBP片段作标准品并包被免疫板。测定前先确定最适MBP片段包被浓度和抗血清稀释度。免疫板包被完毕，取0.1ml样本和0.1ml稀释抗血清加到免疫板微凹中。其后的测定步骤与MBP相同。

3. 统计分析 两组间均值的比较用t检验，阳性率间的比较用χ^2检验。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结 果

1. 各组CSF MBP片段和完整MBP的含量 各组CSF MBP片段和完整MBP的平均含量及阳性率见表1，按$\bar{X}\pm3SD$为99%的正常范围，则对照组各测定值上限：MBP6.3ng/ml，MBP-P1 6.8ng/ml，MBP-P2 4.1ng/ml，MBP-P3 2.0ng/ml，超过此值定为阳性。由表1可看出，多发性硬化组可检测到高浓度MBP-P1 ($P<0.01$)，有重要的临床应用价值；而CSF MBP-P2和MBP-P3仅4例能检出。比较CSF MBP-P1和完整MBP的检测结果发现，MBP-P1的诊断灵敏度（即阳性率）较完整MBP的高 ($P<0.05$)。

2. MS患者CSF MBP-P1的临床意义 由表2可见，各型MS CSF MBP-P_1的阳性率有明显差别，较完整MBP更能反映MS的脱髓鞘活动，且MBP-P1与临床Millar's积分的相关性 ($r_1=0.730$; $P<0.01$) 亦较MBP密切 ($r_2=0.687$, $P<0.05$)。

讨 论

CSF MBP是反映中枢神经脱髓鞘活动的客观指标[1-8][7]。Gupta (1988) 应用RIA法检测CSF MBP片段发现其临床价值较完整MBP的大[1]。我们用酶联免疫法检出了CSF MBP片段，经初步临床研究表明CSF MBP-P1的诊断灵敏度高于完整MBP，且更能反映MS的脱髓鞘活动及临床病情。这一结果与Gupta(1988)等报道的结论相符[1]。MBP-P1检测阳性率高于MBP的机理目前尚不清楚。Gupta等认为MBP检测是选择性测定完整MBP、而MBP片段检测则可测定MBP片段和完整MBP[1][4][5]。结合我们的研究结果，推测凡具有MBP-P1免疫活性位点的MBP类物质均可在MBP-P1检测时被检出。髓鞘受损后CSF中的MBP片段含有一个以上免疫活性位点[4][5]，本研究中少数患者CSF MBP P2或MBP P3增高可能与此有关。

表1 各组患者CSF MBP-P1和MBP的含量(ng/ml)及阳性率(%)

	例数	MBP-P1 均值 ($\bar{x}\pm s$)	MBP-P1 阳性例数 (%)	MBP 均值 ($\bar{X}\pm s$)	MBP 阳性例数 (%)
多发性硬化组	34	13.90±3.12*	26(76)	10.64±2.81*	21(62)
其他神经疾病组	30	8.47±2.24△	12(40)	7.02±1.90△	9(30)
对照组	20	2.30±1.52	0(0)	2.41±1.34	0(0)

* 与对照组比较$P<0.01$ △ 与对照组比较$P<0.05$

表2 各型MS患者CSF MBP和MBP-P1的阳性率

	例数	MBP-P1 阳性例数	MBP-P1 阳性率	MBP 阳性例数	MBP 阳性率
恶化型	14	14	100	12	86
进展型	12	9	75	6	50
稳定型	6	1	17	2	33
好转型	2	0	0	1	50

维普资讯 http://www.cqvip.com

MS四种类型的CSF MBP和MBP-P1阳性率有明显差别。MS稳定型及好转型其完整MBP的阳性率较MBP-P1阳性率高；而恶化型和进展型其MBP-P1的阳性率明显高于MBP。这一结果说明，MBP-P1对恶化型和进展型MS的诊断灵敏度高于MBP；而MBP对稳定型和好转型的诊断灵敏度高于MBP-P_1，提示MBP-P1较能反映MS的脱髓鞘活动，而MBP有助于非活动性MS的诊断。引起各型MS CSF MBP和MBP-P1阳性率明显差别的机理尚不清楚，推测与MBP不同活性位点的清除速率及存在方式不同有关[4][5]。

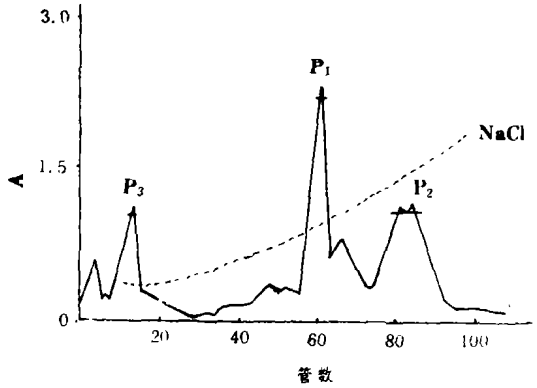


图1 牛脊髓MBP经胃蛋白酶作用后在羧甲基-纤维素的层析结果示意图

我们建立的CSF MBP片段的ELISA检测法与Gupta (1988) 等报道的RIA检测法相比，具有简便易行的优点。与碘标MBP不同，本方法所用试剂均可长期保存[6]，对操作者无放射性损害，其灵敏度和重复性与MBP片段的RIA检测法相似，值得临床上推广应用。

参考文献

[1] Gupta MK, et al. Ann Neurol 1988; 23:274
[2] 向敬，等. 中华医学检验杂志 1990; 13(4): 212
[3] 向敬，等. 中华医学杂志 1991; 71(2):94
[4] Whitaker JN. Neurology 1977; 27:911
[5] Whitaker JN, et al. Ann Neurol 1986; 20:329
[6] Groome NG. J Neurochem 1980; 35: 1409
[7] 董为伟，等. 中华医学杂志 1987; 67(2): 82

(收稿日期1991—03—27)

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS FOR MYELIN BASIC PROTEIN FRAGMENTT IN CEREBROSPINAL FLUID

Xiang Jing, et al
Institute of Neuroloy

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Myelin Basic Protein (MBP) fragments (termed as MBP-P1, MBP-P2 and MBP-P3) were developed in present study. The intact MBP and MBP fragments in cerebrospinal fluid were detected in 34 patients with Multiple Sclerosis(MS)and 30 patients with other neurological disorders (OND). The results demonstrated that, only MBP-P1 and intact MBP were there being a significant difference between patients with MS and control subjects ($p<0.01$). The diagnostic sensitivity of MBP-P1 (76%)was higher than that of MBP (62%), the levels of MBP-P1 was the highest in MS group, and there was close correlation between levels of MBP-P1 and Millar's score ($r=0.730$, $p<$

维普资讯 http://www.cqvip.com

SOD促进大鼠结肠吻合口愈合的作用

第一医院 普外科 傅仲学 韩文妙

提 要 雄性Wistar大鼠124只随机分成对照组和SOD组，分别观察结肠吻合术后1、3、7天吻合口抗张强度、羟脯氨酸含量、组织学改变及血浆MDA含量，结果显示：SOD组吻合口抗张强度及羟脯氨酸含量均显著高于对照组（$P<0.01$或$P<0.05$）；术后1、3天SOD组血浆MDA含量显著低于对照组（$P<0.05$）；组织学显示SOD组较对照组炎症轻、胶原纤维束多、粘膜修复快。提示SOD有促进大鼠结肠吻合愈合口的作用

关键词 超氧自由基；SOD；结肠吻合；伤口愈合
中图分类号 R 656.9

吻合口漏是结直肠手术后早期严重的并发症和重要死亡原因。国外对影响肠吻合口愈合的因素进行了大量研究。近年来，国外仅少数研究提示超氧自由基（O_2^-）影响肠吻合的愈合，而其清除剂SOD（超氧化物歧化酶）等有促进肠吻合口愈合的作用[1,2]。有关SOD与结肠吻合口愈合的关系，国内外尚未见报道。本研究旨在观察国产SOD对大鼠结肠吻合口愈合的作用并探讨其作用机理。

实验方法

1. 动物分组 雄性Wistar大鼠124只随机分成8组。A_1、B_1和C_1组为SOD组，其相应对照组为A、B、C组。以上每组大鼠n=17。SOD（系长沙生物化学制药厂生产）组经尾静脉注药（20,000u/kg体重），术前及术毕各一次；对照组同法注射生理盐水。A与A_1、B与B_1、C与C_1组分别于术后1、3、7天处死。D组（n=12）于结肠吻合术后即刻处死。E组（n=10）未行手术，仅取血测血浆丙二醛（MDA）含量。

2. 手术程序 大鼠术前禁食一天，自由饮水。2%戊巴比妥钠（30mg/kg）腹腔内麻醉。切口区除毛。消毒铺巾。经下腹正中纵切口进腹。在左腹股沟韧带上3cm平面切除其近端结肠1cm。结肠两断端作单层间断内翻端端吻合。

3. 标本收集 A、B、C、D、A_1、B_1及C_1各组均随机取4只以吻合口为中心的2cm肠管，用甲醛液固定后作组织学检查。余大鼠（除D组外）均于处死前取血测定血浆MDA；处死后则切取以吻合口为中心的6cm肠管，用于测定吻合口抗张强度和羟脯氨酸含量。

4. 观察指标及测定方法 （1）吻合口抗张强度，用Y361-3型单纱强力机测定，单位牛顿(N)。(2)吻合口羟脯氨酸含量，参照Huszar等[3]方法测定。(3)血浆MDA含量，用八木固夫法[4]测定。(4)组织学检查，标本经石蜡包埋后切片，分别行HE和VG染色，于光学显微镜下观察吻合口的炎症反应、粘膜修复及胶原纤维等情况。

5. 统计学处理 酌情选用t检验、方差分析

0.05). We consider that the MBP-PI in cerebrospinal fluid is a useful laboratory index of demyelination in MS

KEY WORDS Myelin Basic Protein; Myelin Basic Protein Fragments; Cerebrospinal Fluid; Enzyme-Linked Immunosorbent Assays