DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.038

常和良性肝病GGT间差异不显著($P>0.05$)。说明ConA可有效的识别出肝癌和非肝癌GGT。基于此特性,可建立检测肝癌GGT的植物凝集素亲和技术。

3 讨论

血清GGT同工酶属次级同工酶,同工酶间蛋白质的一级结构均相似,差别仅在糖链的组成上。Joris[5]在研究肝脏疾病中,血清GGT与植物凝集素的关系时,发现5种植物凝集素中,唯有ConA与肝病血清GGT结合有特性,表现出与正常人GGT的结合性强,与肝硬化和转移性肝癌的GGT结合性较弱(未做肝细胞肝癌病例)。Hideo等研究肝癌GGT的分子组成时,发现88%~92%的正常肝GGT与ConA结合,38%~85%的肝癌GGT与ConA结合。Akira和Katsuko等分别发现植物血球凝集素(PHA)也可识别经神经氨酸酶处理了的肝癌GGT。丁邦裕等[4]也曾用江苏菜豆凝集素(E-PHA)分离检测肝癌GGT。该凝集素应用时,需用神经氨酸酶处理血清GGT数小时,才能识别出正常与肝癌GGT,故费时,不适合临床实验室诊断。本实验选择ConA做为亲合配体,为建立一种简便、快速、适于临床应用的检测肝癌GGT的方法奠定了基础。

关键词 肝细胞肝癌;伴刀豆球蛋白A;γ-谷氨酰转移酶
中图法分类号 R392.11;R735.704 文献标识码 B

参考文献

[1] 梁扩寰主编. 肝脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.213-223.
[2] 黄中伟,姚登福,孟宪镛. γ-谷氨酰移换酶肝癌特异区带定量检测的临床意义[J]. 中华内科杂志,1995,34(2):123.
[3] 孟宪镛. 肝癌标记物研究进展[J]. 国外医学:内科学分册,1990,17(1):54-58.
[4] 丁邦裕,载美红,张锡丝,等. 应用江苏菜豆凝集素亲合柱层析检测肝癌特异γ-谷氨酰转肽酶[J]. 临床检验杂志,1991,9(1):14-15.
[5] Joris R De. Marc L De, Ivan K De, *et al*. Lectin affinity chromatography of serum gamma-glutamyltransferase in liver disease[J]. Clinica Chimica Acta, 1987, 162(3):311-318.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2000)03-0295-03

技术方法

大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛模型的制备

Establishment of cerebral vasospasm model after subarachnoid hemorrhage in rats

代佳平[1],冯 华[2],刘 昕[1],王宪荣[2] (第三军医大学:[1]基础医学部分子遗传学教研室;[2]附属西南医院神经外科;重庆 400038)

提 要 目的:为了深入研究SAH后CVS的发生机制及其治疗效果。方法:42只大鼠随机分:A组:正常对照组;B组:注射0.9%氯化钠对照组;C组:采用0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml自体动脉血注入大鼠枕大池制作CVS模型。观察大鼠的存活、临床表现、血压、血气分析、rCBF测定及病理学检查等。结果:B组大鼠均存活,临床表现典型及和病理学改变轻微,与A组差异不明显。C_4:大鼠均存活,但反应迟钝,自洁性差,血压短暂升高,rCBF下降明显,持续时间长;颅底出血,颅底动脉管壁破坏、层次结构消失,与B组差别显著。$C_{1\sim3}$组大鼠死亡率高。C_5组大鼠临床表现肌病理改变不明显。结论:注射0.2 ml时,大鼠存活率高,临床表现典型,rCBF降低和病理改变明显,而且与慢性出血性脑血管痉挛相一致,是最理想的CVS模型。

脑血管痉挛(Cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)病人致死致残的主要原因之一,近来的研究也显示,创伤SAH后CVS也是影响严重颅脑创伤病人预后的重要因素[1]。为深入研究SAH后CVS发生的机制并探讨各种干预措施,我们利用大鼠枕大池注血法制备了实验性SAH模型,报道如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370685)
作者简介:代佳平(1969.9),女,重庆市壁山县人,助理实验师,主要从事蛛网膜下腔出血方面的研究。电话:(023)68752257
收稿日期:1999-01-14;修回日期:1999-04-13

1 材料与方法

1.1 动物分组

Wistar大鼠42只,雌雄不拘,体重220~250 g,随机分为7组,A组:正常对照组;B组:在大鼠枕大池注入0.9%氯化钠注射液;C组:在大鼠枕大池注射自体动脉血,剂量按0.5、0.4、

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.3、0.2、0.1 ml 分为 C_1～C_5 组，每组 6 只，见表 1。

表 1 大鼠分组与存活比

	A	B	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
枕大池注射(ml)	-	0.2	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
存活比	6/6	6/6	0/6	0/6	3/6	6/6	6/6

1.2 动物准备

动物采用 25% 乌拉坦腹腔麻醉(0.25 g/kg)，大鼠右侧股动脉插管接 HP73152A 多导生理监护仪持续记录血压，肛管插入温度探头持续监测体温并维持体温在 37℃左右，每组动物中均有部分动物做动脉血血气分析。

1.3 SAH 制作

动物俯卧固定于江湾Ⅰ型立体定向仪上，切开顶枕部中线皮肤，分离肌肉及骨膜，暴露颅骨及环枕筋膜，细针穿刺枕大池，抽出脑脊液 0.1 ml 左右，缓慢注入自体动脉血或 0.9% 氯化钠注射液，TH 胶封闭穿刺孔后逢合伤口，动物取头低尾高位维持 30 min。A 组仅暴露颅骨及环枕筋膜后逢合伤口。术后动物连续 3 d 腹腔注射青霉素钠 10 万 u。

1.4 顶部皮层局部脑血流量(rCBF)测定

B 组及 C_4 组动物均在右顶部用直径 5 mm 小型环钻开骨窗，中心位于 Bergma 点后 1 mm，后外方 3 mm。将 LDF3 型激光多普勒血流仪探头固定于定向仪微推进器上，分别于制备 SAH 前，SAH 时及 SAH 后 1、4、12、24 h、3、7、14 及 21 d 时观察 rCBF。

1.5 病理学检查

预实验时 2 只大鼠枕大池穿刺后注入 25% 伊文氏蓝观察。动物实验后开胸行升主动脉插管，10% 福尔马林或 1% 戊二醛-1% 多聚甲醛原位灌注，开颅取脑，大体观察，并取顶叶皮层、海马脑干及基底动脉，常规方法制备光镜及电镜标本，HE 染色，光镜观察；超薄切片 JEM-2000EX 电镜观察。

1.6 统计学分析

数据用 t 检验。

2 结果

2.1 动物存活情况

B 组、C_4、C_5 组大鼠均存活，C_1，C_2，C_3 组大鼠死亡率高，见表 1。

2.2 动物行为与血压、血气变化

A 与 B 组动物麻醉维持约 8 h，且动物饮水、摄食及活动无明显差别。C_4 组动物意识恢复时间约 16 h，且动物苏醒后反应迟钝，呈头低位倦缩状，主动攻击性消失，饮水、摄食活动下降，自洁性差，约 7 d 逐渐恢复，大多数动物球结膜严重充血，7 d 左右结痂，无偏瘫或截瘫。B 组及 C_4 组动物在注血或注水时血压升高，30 min 后恢复至正常；SAH 前后 PaO2 及 pH 均无明显变化。

2.3 rCBF 的变化，见表 2

表 2 B 组与 C_4 组 SAH 前后 rCBF 变化的比较(%)

组别	SAH 前	SAH 时	SAH 后								
			0.5 h	1 h	4 h	12 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
B	100	46.6**	87.9**	93.2	96.5	98.0	100	100	100	100	100
C_4	100	49.4**	86.6**	79.8**	67.7**	64.8**	66.0**	76.4**	83.2**	88.0**	95.0*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ 与 SAH 前相比

2.4 病理学观察

预实验 2 只大鼠，见伊文氏蓝主要在颅底动脉环及基底动脉染色，小脑半球及颈髓中度染色，大脑半球轻度染色；B 组动物大体解剖无明显异常；C_4 组大鼠颅底动脉环及基底动脉被血凝块包裹，中颅底及后颅底均有血凝块残留，7 d 时血凝块大部分吸收；光镜见 A 组及 B 组动物基底动脉呈园状，血管壁无异常；C_4 组 SAH 后 1 h 至 14 d 基底动脉管腔不规则，严重时呈缝隙状，且血管改变与 rCBF 变化一致，部分血管壁有炎性细胞粘附；电镜下 A 组与 B 组动物基底动脉无明显变化；C_4 组早期(24 h 内)基底动脉外膜肿胀，蛛网膜下腔内红细胞积聚，可见白细胞与基底动脉外膜粘附浸润，后期主要为平滑肌及内皮细胞变化，肌细胞结构模糊，间质水肿，电子密度降低，内皮细胞变性，胞内线粒体肿胀，部分空泡化，基膜增厚，疏密不均，并可见平滑肌、基膜及内皮细胞形成的丘状隆起突入管腔内，其结构紊乱，无正常血管壁的层次感。

3 讨论

实验结果表明，自体动脉血注入大鼠枕大池制作的 CVS 模型，在注血 0.3～0.5 ml 时，大鼠死亡率高，而注血 0.1 ml 时，临床表现和病理改变不明显，因此，两者都不能满足实验要求。但在注血 0.2 ml 时，大鼠存活率高，临床表现典型，rCBF 降低明显，持续时间长，出现双低值，符合临床表现规律，rCBF 降低程度和持续时间与慢性出血性脑血管痉挛相似[4]，光镜和电镜所见基底动脉壁以器质性病变为主，也与慢性出血性脑血管痉挛相一致[3～5]。此外，还有平滑肌、肌膜及内皮细胞形成丘状隆起现象，此病理改变尚未见报道，值得进一步研究。由此可见，0.2 ml 自体动脉血注入大鼠枕大池制作的 CVS 模型是最理想的，它与用灵长类等动物从枕大池到颅底动脉穿刺，及从单次注血模型到二次注血模型的制作方法相比[2,3]，具有大鼠脑血管解剖生理接近人类，可获取生理、生化、药理及形态等多方面资料。本制作方法操作简单容易掌握，稳定可靠，重复性好及价格低廉等优点，值得推广应用。

关键词 蛛网膜下腔出血；脑血管痉挛

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中图法分类号 R743.35 文献标识码 B

参考文献

[1] Kakarieka A, Braakman R, Schakel E H. Subarachnoid hemorrhage after head injury[J]. Cerebrovasc Dis, 1995, 5(4): 403.

[2] Ram Z, Sahar A, Hadani M. Vasospasm due to massive subarachnoid hemorrhage—a rat model[J]. Acta Neurochir (Wien) 1991, 110(3-4): 181—184.

[3] 刘佰运, 王忠诚, 吴建中, 等. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发生机制研究[J]. 中华神经外科杂志, 1995, 11(4): 226.

[4] Macdonald R L, Wier B A K. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm[J]. Stroke, 1991, 22(8): 971—982.

[5] Chatte D, Rusch N. Prevention of chronic experimental cerebral vasospasm with iburofen and high-dose methlprednisolone[J]. J Neurosurg, 1983, 59(6): 925—932.

(编 辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2000)03-0297-02

技术方法

尿中Ⅳ型胶原检测在诊断糖尿病肾病中的应用

Detecting urinary type Ⅳcollagen in the diagnosis of diabetic nephropathy

杨 沛, 陈 伟, 梁启中, 霍加勇 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

提 要 目的: 探讨 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)检测对诊断糖尿病肾病的作用。方法: 用 ELISA 法检测 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ-C 浓度。结果: 健康对照组尿液Ⅳ-C 含量为(4.47±1.72) ng/ml; 糖尿病正常白蛋白尿组尿液Ⅳ-C 含量为(6.12±3.02) ng/ml; 糖尿病微量白蛋白尿组为(12.07±4.43) ng/ml; 糖尿病大量白蛋白尿组为(14.53±9.12) ng/ml; 非糖尿病肾病组浓缩尿Ⅳ-C 含量为(4.68±2.01) ng/ml。糖尿病人随着尿白蛋白分泌率(AER)增加, 血清和尿中Ⅳ-C 浓度也逐渐增加。结论: 用 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ-C 的效果显著, 血清和尿中Ⅳ-C 检测在诊断糖尿病肾病方面是有效的指标, 可作为糖尿病肾病(DN)和非糖尿病肾病(NDRD)的鉴别指标。

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetic mellitus, DM)的主要并发症, 病理基础是糖尿病性微血管病变, 表现为肾小球硬化, 而肾小球基底膜的主要化学成份是Ⅳ-C(Type Ⅳcollagen), 因此, Ⅳ-C 在 DN 的发生、发展过程中起作非常重要的作用。对 DN 病人血清中Ⅳ-C 变化的研究已见广泛报道[1~3], 但研究 DN 病人尿中Ⅳ-C 变化的报道还很少。本研究采用 ELISA 法检测 PEG-4000 浓缩尿中的Ⅳ-C, 观察尿中Ⅳ-C 在 DN 时的变化及临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本院 1997 年 11 月至 1998 年 5 月之间 50 例 NIDDM 住院病人, 其中 16 例为正常白蛋白尿 A 组: 年龄(56±10)岁, 病程(14±5)年, HbA1C 为(7.0±1.2)%, Ccr 为(87±20) ml/min; 22 例为微量白蛋白尿 B 组: 年龄(57±10)岁, 病程(16±6)年, HbA1C 为(6.9±0.8)%, Ccr 为(87±16) ml/min; 12 例为大量白蛋白尿 C 组: 年龄(57±7)岁, 病程(16±4)年, HbA1C 为 7.0±0.7)%, Ccr 为(68±24) ml/min; 本院同期 20 例非糖尿病肾病(Nondiabetic renal disease, NDRD)病人为 D 组(8 例 IgA 肾病, 8 例肾硬化, 4 例膜性肾病); 16 例本科室人员为正常对照组(H 组)。所有各组人员均不伴有结缔组织疾病及肝脏疾病。对 B、C、D 3 组进行肾活组织检查, 以确定糖尿病肾病和非糖尿病肾病。

1.2 方法

将 24 h 尿标本混匀, 取 10 ml 离心(450× g, 5 min)取上清液, 缓慢加入 10 g/L 牛 γ-球蛋白液 0.8 ml, 振荡混匀, 缓慢加入 450 g/L 的 PEG-4000 溶液 5 ml, 使 γ-球蛋白最终浓度为 0.5 g/L, PEG-4000 最终浓度为 150 g/L, 在 4°C 孵育 5 min, 然后于 TLL-C 台式高速冷冻离心机离心沉淀(18 000× g, 30 min), 弃上清液, 用生理盐水充分溶解沉淀至 1 ml, 即得到浓缩尿标本。然后用 IV-C 酶联免疫测定试剂盒(中国科学院上海细胞生物研究所), 检测浓缩尿和血清中的 IV-C, 于 DG3022 酶联免疫检测仪 450 nm 比色, 根据标准曲线得出结果。

1.3 统计学分析

数据表达均为 $\bar{x}\pm s$, 组间数据比较采用 Student's t 检验和 t' 检验。

2 结果

2.1 PEG-4000, γ-球蛋白最适浓度选择

取不同浓度的 PEG-4000 进行回收试验, 结果发现, 回收率随 PEG-4000 浓度增加而增加, 当达到 150 g/L 时, 回收效果最好, 灵继续增加 PEG-4000 浓度, 回收率缓慢降低。取不同浓度

作者简介: 杨 沛(1964.2), 男, 四川省崇州市人, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事临床生化方面的研究。电话: (023)68757272

收稿日期: 1999-09-17; 修回日期: 1999-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net