

PVP 治疗合并 COPD 的胸腰椎压缩性骨折患者术后肺功能改善的研究

王湘江*, 汤勇智, 刘春磊, 王贵清, 杨立群, 黎昭华, 侯翰涛, 陈 勇

(清远市人民医院, 广州医科大学附属第六医院, 广东 清远 511518)

摘 要: **目的** 研究经皮椎体成形术(PVP)治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并骨质疏松性单节段胸腰椎压缩性骨折患者肺功能变化。**方法** 对38例COPD合并单节段骨质疏松性胸腰椎压缩性骨折患者进行了椎体成形术,分别测量术前及术后1周、3月及12个月后患者肺功能、VAS评分及活动能力评分,统计分析患者术前、术后的变化。**结果** PVP术后患者VAS评分及活动能力评分降低,术后1周显著降低,并且随着时间推移评分逐渐降低。患者手术前后肺活量(VC)、用力肺活量(FVC)、第一秒钟用力呼气容积(FEV1)及最大分钟通气量(MVV)间差异存在显著性($P<0.05$)。术前及术后VAS评分与活动能力评分改善值之间,VAS评分与各肺功能指标改善值之间存在显著正相关性($P<0.05$)。**结论** PVP术后COPD的单节段骨质疏松性胸腰椎压缩性骨折患者疼痛明显缓解,活动能力及肺功能得到改善。

关键词: 经皮椎体成形术; 慢性阻塞性肺疾病; 肺功能

中图分类号:R683 文献标识码:A

Influence of Pulmonary Function for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients with Thoracolumbar Osteoporotic Vertebral Compression Fractures After Percutaneous Vertebroplasty (PVP)

WANG Xiangjiang, TANG Yongzhi, LIU Chunlei, et al

(Qingyuan People's Hospital, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of respiratory function in patients affected by chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with single thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fractures treated with vertebroplasty (PVP). **Methods** Thirty-eight patients affected by COPD and single thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fractures underwent PVP. VAS scores, mobility scores and pulmonary function were measured for all patient before and one week, three months, twelve months after PVP. Statistic software was used to analyse the preoperative and post-operative changes. **Results** A significant VAS-score decrease was observed 1 week after PVP, with a subsequent decrease overtime; A significant variation ($P<0.05$) was observed between the VAS score values, VC, FVC, FEV1 and MVV values before the procedure and after treatment. A significant correlation was observed between improvement of VAS-score values and mobility scores, and improvement of VAS-score values and the pulmonary function indexes. **Conclusions** PVP can significantly release pain and improve pulmonary function and mobility in patients with moderate and severe COPD affected by single thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fractures.

Key words: PVP; COPD; pulmonary function

骨质疏松症已被广泛认可为慢性阻塞性肺疾病

(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者的主要并发症,有研究显示 COPD 患者有 20%~58% 并发骨质疏松^[1],特别是中、重度 COPD 患者^[2]。而椎体压缩性骨折是骨质疏松中最常见的

骨折,80%椎体压缩性骨折发生在胸腰段^[3]。目前经皮椎体成形术(percutaneous vertebroplasty,PVP)被认为是治疗骨质疏松性压缩性骨折安全和有效的手术方法。PVP 术后患者疼痛迅速缓解和活动能力得到改善,比保守治疗具有明显优势。本文旨在探讨 PVP 治疗合并 COPD 的单节段胸腰椎压缩性骨折患者肺功能变化情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2011 年 6 月~2014 年 6 月,选取本科室合并 COPD 单节段骨质疏松性胸腰椎压缩性行 PVP 患者 38 例,其中 T8 3 例,T9 4 例,T10 3 例,T11 7 例,T12 8 例,L1 10 例,L2 3 例;其中男 21 例,女 17 例;平均年龄 68.5 岁,年龄 62~78 岁。所有患者术前脊柱 X 片上表现为骨质疏松压缩性骨折,均经 MR 检查证实为新鲜性压缩性骨折。所有患者均存在严重背痛,保守治疗无效,发病不超过 3 个月。排除有根性疼痛和脊髓神经相关症状的患者。

1.2 手术方法 所有手术均由同一组医师操作完成。根据患者全身情况选择俯卧位或侧卧位,均采用局麻,在 C 型臂 X 线机透视定位下经单侧或双侧椎弓根途径,穿刺针通过椎弓根,深度达椎体前 1/3。确认穿刺针位置良好后,去除针芯。调制 PM-MA 骨水泥至黏稠状态,在正、侧位 X 线间断透视监控下用注射器接穿刺针注入伤椎。X 线透视见骨水泥沿骨小梁间隙浸润,边缘毛刺状至骨皮质为止,若发现骨水泥浸润至椎体后缘或向椎体外渗漏则立即停止推注。骨水泥完全硬化后,拔出穿刺针。

1.3 测量方法

1.3.1 肺功能测定 在术前及术后 1 周,3 月和 12 个月运用德国耶格公司生产的脉冲振荡肺功能仪,测定各种肺功能指标,主要包括肺活量(VC)、用力肺活量(FVC)、最大通气量(MVV)和第一秒钟用力呼气容积(FEV1),各指标均为 3 次测量后的最理想值。

1.3.2 疼痛评分 运用数字化疼痛模拟评分尺测定患者术前及术后 1 周,3 月和 12 个月疼痛情况,进行视觉模拟数字化评分(VAS)(0 分=无疼痛,10 分=疼痛难以忍受)。

1.3.3 活动能力评分^[4] 活动能力评分 1 分:行动无明显困难;2 分:行走有困难(需帮助);3 分:需使

用轮椅或只能坐立;4 分:被迫卧床。

1.4 统计学分析 所有资料均采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行处理,评价术前及术后 1 周,3 月和 12 个月之间的活动能力评分、VAS 评分、VC、FVC、FEV1 和 MVV 采用配对 *t* 检查,VAS 评分和活动能力评分,VAS 评分和 VC,VAS 评分和 FVC,VAS 评分和 FEV1,VAS 评分和 MVV 的改善值比较采用 spearman 非参数秩和检验相关分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

38 例手术患者均未发生骨水泥渗漏、肺栓塞、手术部位无感染等并发症,均进行 12 个月的完整随访。PVP 术后患者 VAS 评分及活动能力评分降低,术后 1 周显著降低,并且随着时间推移逐渐降低(表 1)。患者术前与术后 1 周,3 月和 12 个月的肺活量(VC)、用力肺活量(FVC)、第一秒钟用力呼气容积(FEV1)及最大分钟通气量(MVV)间差异具有显著性($P<0.05$),术后 1 周、术后 3 月与 12 个月两两间 VAS 评分、活动能力评分及肺功能各指标比较差异无显著性($P>0.05$,表 2)。术前及术后 1 周 VAS 评分改善值(疼痛分值减少量)和活动能力评分及肺功能提高百分率(提高值与术前值得百分比)存在显著性正关联($P<0.05$),术后 1 月、3 月、12 月之间 VAS 评分、活动能力评分及肺功能基本无明显变化,改善不明显,提高百分率与疼痛改善分值之间显然无显著相关性($P>0.05$,表 3)。

表 1 手术前后 VAS 评分及活动能力评分($n=38$,分)

	术前	术后 1 周	术后 3 月	术后 12 月
VAS 评分	7.68±0.79	2.68±0.68 ^a	2.76±0.73 ^a	2.50±0.65 ^a
活动能力评分	3.74±0.67	2.32±0.60 ^a	2.14±0.65 ^a	1.84±0.68 ^a

与术前比较,a: $P<0.05$

表 2 手术前后肺功能变化($n=38$,L)

肺功能	术前	术后 1 周	术后 3 月	术后 12 月
VC	2.34±0.42	2.89±0.56 ^a	3.10±0.48 ^a	3.22±0.45 ^a
FVC	2.31±0.32	2.87±0.34 ^a	2.95±0.36 ^a	3.10±0.48 ^a
FEV1	1.65±0.15	1.88±0.13 ^a	1.98±0.23 ^a	2.10±0.18 ^a
MVV	37.8±17.69	42.7±18.88 ^a	45.8±20.23 ^a	46.7±0.18 ^a

与术前比较,a: $P<0.05$

表3 VAS 评分改善值与活动能力评分、肺功能改善百分率相关关系分析

	术前与术后1周		术后1月与3月		术后3月与12月	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
VC(%)	0.559	0.021	0.251	0.204	0.121	0.359
FVC(%)	0.586	0.04	0.212	0.187	0.012	0.41
FEV1(%)	0.662	0.032	0.254	0.215	0.154	0.116
MVV(%)	0.598	0.028	0.046	0.45	0.027	0.68
活动能力(%)	0.718	0.008	0.254	0.152	0.168	0.221

3 讨 论

COPD 与骨质疏松均为常见性、多发性疾病, COPD 与骨质疏松间存在明显的相关性。COPD 肺外的影响包括骨骼肌肉功能障碍、骨质丢失和骨质疏松^[5], 骨质疏松症已被广泛认为是 COPD 的主要并发症。骨质疏松性脊柱压缩骨折发生后患者出现不同程度的胸腰背痛和椎体后凸畸形限制了胸廓的运动并引起肺容积的减少, 从而导致呼吸功能障碍, 影响了患者的生活质量, 特别是对于 COPD 患者^[6-7]。传统的保守治疗骨质疏松性脊柱压缩骨折部分患者疼痛可缓解, 但长期卧床又可导致骨质疏松程度加重及 COPD 并发症的出现。鲍磊等^[8]研究报道 PKP 术后老年女性脊柱压缩骨折患者胸腰背部疼痛得到缓解, 增强了呼吸肌耐力, 从而改善了患者肺功能。

本文采用 PVP 治疗合并 COPD 的单节段胸腰椎压缩性骨折患者, 术后减轻患者的胸腰背部疼痛, 活动能力得到明显改善。术前及术后 1 周, 3 月和 12 个月的 VAS 评分, 活动能力评分, VC、FVC、FEV1 及 MVV 存在显著性差异, VAS 疼痛评分显示在 PVP 术后 1 周患者疼痛症状已经明显改善, 患者活动能力得到了提高, 疼痛的缓解程度和活动能力的提高呈现正相关, 然而在随后随访中, 疼痛仅仅轻度缓解, 这些结果与普遍而广泛地报道 PVP 的临床效果相符合^[9]。PVP 术后患者肺功能参数 VC、FVC、FEV1 和 MVV 也明显改善, 呼吸功能改善伴随 VAS 评分降低反应了两者之间存在显著关联性, 并在随访期间得到了进一步改善, 与文献报道基本一致^[10]。本文中患者疼痛减轻, 活动能力提高伴随着肺功能的改善, MVV 评分表现了呼吸肌耐力强弱, 骨质疏松患者活动降低从而减少了 MVV^[11], VC、FVC、FEV1 和 MVV 与限制性呼吸功能障碍直接相关, 而限制性呼吸功能障碍进而与胸背部疼痛有关, PVP 术后患者的胸腰背疼痛明显缓解, 呼吸肌耐力

增强, 可能是造成肺功能改善的主要原因。然而 Salvatore 等^[12]研究 PVP 治疗单节段胸椎压缩性骨折合并 COPD 患者后, 他们认为疼痛本身的减轻可能不是改善的唯一原因, 随着时间推移疼痛减轻可能增强胸廓的运动, 而增加了呼吸肌的强度, 从而逐渐改进肺通气功能障碍。Tanigawa 等^[13]报道了对于发生了单节段或者多节段的胸椎、胸腰椎及腰椎的急性或亚急性的骨质疏松性椎体压缩性骨折的患者进行了 PVP 手术, 他们得出由于胸廓运动减少, 疼痛成为改善限制性肺功能通气功能障碍的主要因素, 局部后凸畸形的改善也被认为其中因素之一, 但主要发生在多节段的病例中。

以前很多研究强调后凸畸形纠正和椎体高度的恢复在改善骨质疏松性压缩性骨折患者肺功能的作用^[14-15]; 在这些研究中作者强调 PKP 双重作用, 既减轻疼痛, 又恢复椎体高度和纠正后凸楔形角, 扩大了胸腔容积。而 PVP 术并不能明显增加病椎的高度和改善后凸角度, 但是可以加强病椎的耐压强度, 以及稳定病椎骨折造成的微动, 以减少疼痛症状。本文限制在单节段胸椎或腰椎的骨质疏松性椎体压缩性骨折, 后凸成角的纠正很小, 认为与肺功能参数改善无关联或者很少, 与 Salvatore 等^[13]报道基本一致。Yang 等^[16]也报道尽管后凸楔形角的纠正具有临床意义, 但与肺功能参数无关联。

本研究说明 PVP 有效治疗了合并 COPD 的胸腰椎压缩性骨折患者, 能够改善 COPD 患者呼吸功能障碍并提高生活质量, 建议临床中采用 PVP 手术来治疗这类患者。但本研究也存在一些不足, 患者选择限制在单节段椎体压缩骨折的患者, 实验病例较少, 缺乏对照组及随访时间短, 尚需大样本及长期的随访研究, 以更加客观地评价其临床意义。

参考文献:

- [1] Jorgensen NR, Schwarz P, Holme, et al. The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease-across sectional study[J]. *Respir Med*, 2007, 101(1):177-185.
- [2] Sin DD, Man JP, Man SF. The risk of osteoporosis in Caucasian men and women with obstructive airways disease [J]. *Am J Med*, 2003, 114(1):10-40.
- [3] Wu SS, Lachmann E, Nagler W. Current medical, rehabilitation, and surgical management of vertebral compression fractures[J]. *J Womens Health*, 2003, 12(1):17-26.

(下转第 456 页)

FGF-2 上调 Survivin 蛋白的表达拮抗心肌细胞凋亡

李国华¹, 刘米华^{1,2#}, 彭娟¹, 肖卫晋¹, 屈顺林¹, 唐之晗¹, 郭芳¹, 彭利军^{1,3}, 任重¹, 危当恒¹, 刘录山¹, 王佐¹, 姜志胜^{1*}

(1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学附属南华医院检验科; 3. 南华大学儿科学院 湖南省儿童医院科教科)

摘要: **目的** 探讨成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)拮抗心肌细胞凋亡的作用机制。 **方法** 以 H9c2 大鼠心肌细胞作为实验对象, 用无血清培养基同步化培养 24 小时, 心肌细胞随机分为正常组(Control)、缺氧/复氧(H/R)组和 H/R+FGF-2 组。采用 CCK-8 比色法检测心肌细胞存活率, Hoechst 染色和流式细胞术检测心肌细胞凋亡。采用 Western blot 检测生存素(Survivin)蛋白的表达。 **结果** 与正常组相比, H/R 明显抑制心肌细胞活力, 诱导心肌细胞凋亡(均 $P < 0.01$); 与 H/R 组相比, FGF-2 显著改善 H/R 心肌细胞活力, 拮抗 H/R 心肌细胞凋亡, 同时上调 Survivin 蛋白的表达(均 $P < 0.05$)。 **结论** FGF-2 拮抗心肌细胞凋亡的作用与其上调 Survivin 蛋白表达有关。

关键词: 成纤维细胞生长因子-2; 细胞凋亡; 生存素

中图分类号: R541 文献标识码: A

FGF-2 Inhibits Cardiomyocytes Apoptosis Induced by Hypoxia/reoxygenation via Upregulating the Expression of Survivin in H9c2 cells

LI Guohua, LIU Mihua, PENG Juan, et al

(Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of FGF-2's fighting against H9c2 cardiomyocytes apoptosis induced by Hypoxia/reoxygenation(H/R). **Methods** H9c2 cardiomyocytes was employed as the experimental object, cells were incubated by free serum for 24 h for synchronous cell cycle, then, H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into 3 groups: Normal group(Control), H/R group, H/R+FGF-2 group. The viability of cardiomyocytes was measured by CCK-8. The apoptosis rate of cardiomyocytes was detected by Hoechst and Armexin-V/PI assays with flow cytometry. Survivin expression were analyzed by western Blot. **Results** Compared to the Control group, H/R significantly decreased the viability of cardiomyocytes and induced cardiomyocytes apoptosis($P < 0.01$). Treatment with FGF-2 for H/R significantly increased the viability of cardiomyocytes subjected to H/R, suppressed cardiomyocytes apoptosis induced by H/R and up-regulated the expression of Survivin ($P < 0.05$). **Conclusion** FGF-2 inhibits cardiomyocytes apoptosis induced by H/R in H9c2 cells, which the mechanism may be related to the up-regulation of Survivin expression.

Key words: fibroblast growth factors-2; apoptosis; survivin

成纤维细胞生长因子-2(Fibroblast growth factor-2, FGF-2)是广泛分布在体内各个组织的多功能生

长因子, 具有极强的促有丝分裂作用, 能促进细胞增殖、分化和迁移, 具有强大的促血管新生作用。本课题组和国外其他学者的研究都表明, FGF-2 是一种重要的内源性细胞保护物质, 具有明显的心肌保护作用, 能够拮抗心肌细胞凋亡^[1-4]。FGF-2 拮抗心肌细胞凋亡的作用主要与其结合 FGF 受体 1 (FGFR1), 激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、

收稿日期: 2016-05-08; 修回日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470435、81541005)、湖南省卫生计生科研计划课题(B2011-041)。

* 通讯作者, E-mail: zsjianglab@aliyun.com.

同为第一作者

细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular-signal regulated protein kinase, ERKs) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt), 抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和蛋白激酶 p38 (p38MAPK), 促进 NO、Bcl-2 和间隙连接蛋白 43 (Connexin 43, CX43) 等蛋白表达, 抑制 Bax、Bim 和 p53 等蛋白表达相关^[2,4,5]。然而, FGF-2 抑制心肌细胞凋亡的机制仍未完全阐明。

生存素 (Survivin) 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中最小成员, 是目前发现的效应最强的抑凋亡基因之一, 具有调控细胞周期, 抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖, 促进血管形成等功能, 在肿瘤的发生、发展中扮演重要角色^[6-7]。近期研究表明, Survivin 在心血管疾病中也扮演着重要的角色, 主要发挥抑制细胞凋亡, 促进损伤修复及重构, 促血管新生和细胞增殖等作用^[8]。研究发现, 缺血预处理 (Ischemic preconditioning, IPC)^[9-10]、阿片受体激动剂^[11]、胰岛素^[12-13]、右丙亚胺 (Dexrazoxane, DRZ)^[14] 均可上调心肌细胞 Survivin 蛋白的表达, 抑制心肌细胞凋亡。但是 Survivin 是否在缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 心肌细胞内表达, 以及 FGF-2 对 H/R 心肌细胞中 Survivin 表达的影响及意义, 尚不明确。本研究以 H9c2 大鼠心肌细胞为研究对象, 初步探讨 Survivin 是否在 FGF-2 拮抗 H/R 心肌细胞凋亡中发挥作用, 为缺血性心脏病的治疗提供新思路 and 新的干预环节。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂 H9c2 大鼠心肌细胞系购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM 培养基和胎牛血清为美国 HyClone 公司; Recombinant Rat FGF-2 购于美国 PeproTech 公司; CCK-8 试剂盒为广州奕源生物科技有限公司; 胰蛋白酶、Hoechst33258 凋亡检测试剂盒、兔抗大鼠 Survivin 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗均为江苏碧云天生物技术研究; BCA 蛋白定量试剂盒和兔抗大鼠 β -actin 多克隆抗体均为北京康为世纪生物科技有限公司; FITC Annexin V Apoptosis Detection KitI 购于美国 BD pharmingen 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 心肌细胞的培养与实验分组 H9c2 大鼠心肌细胞接种于含 12% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放在 37

℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞用胰蛋白酶消化传代、收集, 取生长状态良好的心肌细胞进行实验。每次实验前用无血清培养基同步化培养 24 小时, 再加药物预处理。心肌细胞随机分为: 正常组 (Control); H/R 组; H/R+FGF-2 组, 心肌细胞预孵育 10 ng/mL FGF-2 30 分钟, 缺氧 90 分钟, 复氧 120 分钟。

1.3 心肌细胞 H/R 模型的建立 根据文献所报道的方法, 建立心肌细胞 H/R 损伤模型: 同步化的心肌细胞, 更换为无糖和无血清的 Hanks' 平衡盐溶液 (1.3 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 0.3 mM KH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 69 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃ 和 0.3 mM Na₂HPO₄), Hanks' 平衡盐溶液预先用 95% N₂~5% CO₂ 饱和, 将培养瓶或培养板置于持续 95% N₂~5% CO₂ 平衡的缺氧孵育容器中 (O₂ 浓度 $\leq$ 1%), 37 ℃, 90 分钟后, 更换为预平衡 (37 ℃、95% O₂~5% CO₂) 的无血清 DMEM 培养基, 放入 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 120 分钟, 结束实验。

1.4 CCK-8 比色法检测心肌细胞存活率 根据 CCK-8 试剂盒说明书, 将 H9c2 大鼠心肌细胞制成细胞悬液, 计数, 接种于 96 孔培养板中, 100 μ L/孔, 每孔细胞数大于 1000 个, 在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养过夜或大于 5 个小时。当细胞生长到培养孔的 70%~80% 面积时, 加入不同的处理因素, 每个处理因素至少设 3 个复孔和 1 个空白孔。终止处理后, 每孔加 10 μ L CCK-8 溶液, 避免产生气泡, 37℃ 孵育 1.5 小时, 用酶标仪 ($\lambda = 450$ nm) 测定各孔的吸光度 (OD)。取 3 孔 OD 值的平均数, 按公式计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = (处理组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times$ 100%, 至少重复 3 次。

1.5 Hoechst 染色观察心肌细胞凋亡 将心肌细胞悬浮液接种于 6 孔板内, 待细胞贴壁后, 按实验设计给予不同药物处理, 实验结束后, 弃去培养液。PBS 清洗 3 遍, 每次 3~5 分钟, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 分钟, 弃去固定液, 用 PBS 清洗 3 遍, Hoechst33258 染色液染色 20 分钟, 去离子水冲洗 3 遍, 每次 3~5 分钟。在荧光显微镜下, 以紫外光 340 nm 波长激发, 观察并摄片。

1.6 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率 取生长状态良好的心肌细胞, 以 2×10^5 个/mL 的细胞密度接种于 50 mL 的培养瓶, 放在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞长至 70%~80% 融合状态时, 更换为含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培养基同步化培养 24

光检测,荧光显微镜下进行包涵体计数,每张盖玻片随机取5个视野计数,根据公式推算衣原体的数量,以包涵体形成单位(inclusion forming unit, IFU)表示($\text{IFU}/\text{mL} = 5 \text{ 个视野的平均包涵体数目} \times \text{视野校正因子} \times \text{稀释倍数}$),进一步计算 IFU 比值(即同一菌株离心“辅助感染”条件下的 IFU 平均值对“无辅助感染”条件下 IFU 平均值的比例);实验重复五次, IFU 比值以均值 $\pm$ 标准差表示。

1.2.3 吸附试验 CMUT3G40 和 CMUT3G0 的 EB 感染 24 孔板中单层 HeLa 细胞,参考文献^[13]进行:预冷 DMEM 培养基对 EB 进行适当稀释以确保 CMUT3G40 和 CMUT3G0 的 EB 量(IFU 数值)相当,预冷 DMEM 培养基洗涤单层 HeLa 细胞,每孔加入 EB 稀释液 200 μL ,培养板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,随后吸弃衣原体感染液,预冷 DMEM 培养基充分洗涤细胞,按前述方法进行 IFA,荧光显微镜观察计数 EB 数量,每张盖玻片随机选取 5 个视野计数,计数每个视野的 EB 和细胞数量,换算为视野中 EB 数量对细胞数量的比例。实验重复三次(实验结果以均值 $\pm$ 标准差表示)。

1.2.4 CM 基因组 DNA 的提取 将 CMUT3G40、CMUT3G0 和 CMG0 的 EB 感染细胞后扩大培养,大规模感染培养于 6 孔板的 HeLa 细胞,按前述“辅助感染”方法采用 DEAE-葡聚糖预处理单层 HeLa 细胞和室温 1000 r/min 离心 1 h 的方法进行衣原体感染,离心结束后吸弃感染液,加入 4 mL 衣原体培养液后继续培养 24~28 h, PBS 洗涤细胞后胰蛋白酶消化并收获感染 HeLa 细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 500 $\times$ g 离心 10 min 收集细胞沉淀, PBS 重悬,冰上超声裂菌,裂解物 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 500 $\times$ g 离心 10 min 去除较大的细胞残骸,上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 r/min 离心 30 min,细胞沉淀物重悬于 PBS 中,再次超声裂菌,加入 RNaseA 和 DNase I 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 以去除宿主细胞 DNA 和 RNA,转移上清至超速离心管,密度梯度离心法分离纯化 EB, PBS 洗涤后 EB 置于含 100 mg/L 蛋白酶 K 的 EB 裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100, 0.5% SDS)中 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,参考操作说明, QIAamp DNA 抽提试剂盒提取 CM 基因组 DNA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 基因组测序、注释和生物信息学分析 采用 Illumina Hiseq2000 测序技术平台完成 CMUT3G40、CMUT3G0 和 CMG0 的基因组深度测序,由

UTHSCSA 格里希儿童癌症研究中心(GCCRI)基因组测序小组完成;其实验步骤如下:使用 Covaris S220 超声波破碎仪超声打断基因组 DNA 而形成 DNA 片段,随后采用 TruSeq DNA 样品制备试剂盒构建 DNA-Seq 测序文库, DNA-Seq 测序文库在 Illumina Hiseq2000 平台采用 50 bp 的单端测序模块进行测序,测序得到的原始数据经过 CASAVA 程序分用(demultiplexing)后,序列读取信息采用 FASTQ 格式输出,利用 BWA-MEM 计算程序^[14]与 CM 染色体基因组参考序列(GenBank accession No. NC_002620.2)和质粒基因序列(NC_002182.1)进行比对分析,此时产生的 SAM(Sequence alignment map)文件转换成 BAM(Binary alignment map)格式,利用 Samtools^[15]排序。插入和缺失(indels)使用默认参数的基因组分析工具包(Genome analysis toolkit)^[16]进行重新排列。随后参考文献方法对所有突变及对应的基因、蛋白进行数据处理与分析^[13]。

1.3 统计方法 采用 Kruskal-Wallis 检验方法进行检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 离心因素对 CM 体外培养的影响

CMUT3G0 菌株感染宿主细胞时在离心“辅助感染”条件下较“无辅助感染”条件形成较多包涵体, IFU 比值在 70 左右,与质粒携带菌株 CMG0 的 IFU 比值(40 左右)比较,二者差异有统计学意义(图 1)。传代菌株 CMUT3G40 在离心“辅助感染”条件下包涵体形成情形与“无辅助感染”条件下差距不大, IFU 比值在 6 左右,与 CMG0 菌株或 CMUT3G0 菌株的 IFU 比值比较,差异有统计学意义(图 1)。

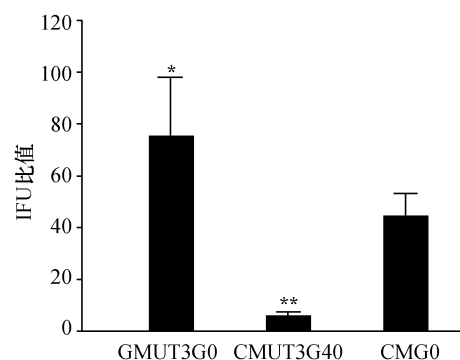


图1 离心因素对 CM 体外培养的影响 CMUT3G0 与 CMG0 相比, *: $P < 0.05$; CMUT3G40 与 CMG0 或 CMUT3G0 比较, **: $P < 0.01$