

**宣武区医学会 2003 年度
学术论文集**

目 录

514 例原发性高血压患者血压昼夜节律分析	(1)
糖耐量低减者脑血管病变的临床分析	(6)
SYBR Green I PCR 检测人类白细胞抗原-DRB1 * 12	(10)
中医药治疗 SARS 恢复期的临床疗效评价	(15)
宣武区某工地 SARS 爆发疫情的流行病学调查	(25)
记忆合金网二期成形人工气管置换术	(29)
家族性阿尔茨海默病的早老素-1 基因突变三例报告	(34)
支原体肺炎患儿辅助性 T 淋巴细胞亚群 Th1、Th2 细胞状况	(39)
药物协同作用诱发脑胶质瘤患癫痫发作一例	(45)
北京市广外社区高龄老人健康状况及卫生服务需求的调查研究	(47)
中药糖微康对糖尿病大鼠肾皮质 TIMP-1 表达的影响	(54)
降压舒心胶囊对实验肾性高血压大鼠左心室肥厚、血压和心率的影响	(58)
清开灵注射液治疗银屑病血热证观察	(62)
消痔灵双层四步注射治疗成人完全性直肠脱垂 117 例	(65)
余桂清治疗乳腺癌经验	(68)
对一例先天鱼鳞病患儿的护理体会	(72)
渗出型老年性黄斑变性玻璃体积血的追踪观察	(75)
桶装水开封后保质期探讨	(78)
宣武区管理非典密切接触者发病情况及分析	(81)
陶然亭社区卫生诊断报告	(85)
经皮血管内支架成型术在颅内血管疾病的初步应用	(90)
粘附分子基因表达在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤中的作用	(96)
血管内支架置入治疗高危颈动脉狭窄	(100)
北京与其它地区临床分离的肠球菌的耐药性比较分析	(107)
复方中药对肝硬变大鼠肝组织内皮素-1 mRNA 表达的影响	(112)
肝硬化患者胃排空与小肠通过时间的研究	(116)
体外冲击波碎石术配伍熊去氧胆酸治疗胆囊结石的临床疗效观察	(120)
围生期保健知识知晓率调查	(125)
浅谈糖尿病足的诊治体会	(130)
浅析入院前测定病毒性肝炎的临床意义	(133)
三法综合治疗观察带状疱疹性疼痛 68 例	(136)
不同原因所致二尖瓣脱垂超声、手术及病理对比分析	(138)

针灸治疗前列腺增生 53 例	(141)
肺老化的 CT 评价	(144)
心衰颗粒对慢性充血性心衰患者心功能的影响	(151)
我院实施医护患一体化改革的做法与体会	(155)
硝苯地平与伊那普利治疗糖尿病伴高血压的比较	(157)
宣武区传染性非典型肺炎发病情况流行病学分析	(159)
肺结核病患者结核菌素试验观察	(164)
宣武区首例非典型肺炎病例分析	(168)
医疗单位消毒效果分析及对策	(171)
二级医院“借鸡下蛋”式开展急诊 PCI 治疗急性心肌梗塞的可行性研究	(174)
蒙诺和合心爽治疗糖尿病肾病的疗效观察	(176)
三磷酸腺苷阻断房室结前向传导的剂量与房室结前传功能的相关性研究	(179)
月经病的周期性治疗	(183)
CT 脑灌注成像在短暂性脑缺血发作的初步研究	(187)
胆囊息肉样病变 56 例临床诊治体会	(194)
疝环充填式无张力疝修补术治疗腹股沟疝 193 例报告	(197)
小儿目割与脾胃的关系辨析	(200)
SARS 的胸部 X 线表现及动态观察	(202)
单纯疱疹病毒 I 型感染胎鼠原代神经元细胞模型的建立	(207)
复方 861 对 HSC-T6 细胞组织基质金属蛋白酶抑制因子 1 基因表达的影响	(214)
Characteristics of subthalamic neuronal activities in Parkinson's disease	(219)
40 例小儿支原体肺炎治疗体会	(229)
嵌顿性腹股沟直疝病因和临床诊治的认识进展	(232)
生物活性染色剂在白色白内障囊内切除术中的应用	(237)
全膝关节置换术髌骨置换与不置换的比较	(241)
多发性硬化周围神经损害的肌电图及病理研究	(247)
退行性二尖瓣腱索钙化的超声表现(附 7 例报告)	(255)

514 例原发性高血压患者血压昼夜节律分析

首都医科大学宣武医院心内科 100053

许 骥 华 琦 刘荣坤

摘 要:目的 探讨原发性高血压患者昼夜节律曲线类型和年龄、性别、眼底小动脉、肾功能及血管内皮功能之间的关系。方法 选择初诊原发性高血压患者 514 人,根据动态血压检测结果将昼夜节律曲线分为反杓型、非杓型、杓型和超杓型四组。检测 24 小时动态血压、眼底、血液生化及血管内皮功能。结果 不同血压曲线类型之间收缩压、舒张压、脉压以及年龄有显著差异($P<0.05$);随年龄增长,超杓型组、非杓型、杓型组至反杓型组比例依次升高,而性别、眼底动脉硬化程度、尿素氮、血肌酐、内皮素及一氧化氮无显著性差异。结论 四种血压节律曲线类型与年龄明显相关,而与眼底小动脉硬化程度、肾功能、血管内皮功能之间无明显相关关系。

关键词:高血压 动态血压监测 血压昼夜节律

Analysis of the circadian rhythm of blood pressure in

514 patients with primary hypertension

Xu Ji, Hua Qi, Liu Rongkun

Cardiovascular department, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053

Abstract: **Objective** To study the relationship between the types of blood pressure circadian rhythm and the indexes such as systolic blood pressure, diastolic blood pressure, pulse pressure, age, sex, arteriosclerosis of fundus oculi, and other blood serum markers (BUN, CRE, NO, ET). **Methods** Examination of fasting blood BUN, CRE, NO, ET and 24h ambulatory blood pressure monitoring were performed in 514 initially untreated patients with primary hypertension. The patients were divided into four groups according to their blood pressure rhythm (deep dippers, nondippers, dippers and reverse dippers). **Results** There were significant differences in systolic blood pressure, diastolic blood pressure, pulse pressure and age in different group. But there were no significant differences in sex, arteriosclerosis of fundus oculi, and other serum markers (BUN, CRE, NO, ET). **Conclusion** The types of blood pressure rhythm are influenced by age, but it is not associated with BUN, CRE, NO, ET and arteriosclerosis of fundus oculi.

Key words: Hypertension Ambulatory blood pressure monitoring Circadian rhythm

近年来有关高血压的研究不断深入,血压昼夜节律的变化越来越受重视。人们将不同昼夜节律的波动形象地分为杓型和非杓型,并且就不同分型之间在脉压,收缩压以及相应的靶器官损伤等方面的差异作了一系列研究,但回顾以往,大多数研究样本较小或仅对几方面进行了分析。本研究经过较长时间的资料收集,并结合关于血压昼夜曲线的最新分型对昼夜节律和多项指标之间的关系进行了进一步探讨,以期对高血压的认识及治疗有所帮助。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 1998 年 7 月至 2002 年 10 月在我院心血管门诊就诊的初诊原发性高血压患者 514 人,均未经降压治疗或停用降压药物两周以上。其中男性 263 人,女性 251 人,平均年龄 47.23 岁。依据 WHO/ISH^[1]以及我国高血压指南中的诊断标准^[2]做出高血压诊断,并经详细询问病史及体检除外继发性高血压以及合并有影响血压昼夜节律的一些疾病如充血性心衰,严重失眠,糖尿病等。

1.2 方法

1.2.1 动态血压监测

采用无创性携带式 Medilog DX 型动态血压监测仪(英国 Oxford 公司),袖带缚于受试者右上臂,从 8-9Am 到次日 8-9 Am 自动充气监测 24 小时血压、心率。白天(6 Am-10 Pm)间隔 20 分钟,夜间(10Pm-次日 6Am)间隔 30 分钟。嘱病人保持日常工作和活动。若有效血压读数少于 80%或每小时区间内有读数缺漏,则隔日重测。

1.2.2 研究指标

按血压的昼夜节律分为四种血压曲线。差值百分比=(白天平均动脉压均值-夜间平均动脉压均值)/夜间平均动脉压均值 $\times 100\%$ 。根据差值百分比情况定义四种曲线如下:(1)反杓型:差值百分比 <0 。(2)非杓型:差值百分比在 0~10%之间。(3)杓型:差值百分比在 10~20%之间。(4)超杓型:差值百分比在 20%以上。

按血压曲线类型将这 514 例患者分为四组,四组的比例如下:(1)反杓型组:共 39 例(男性 18 例,女性 21 例);(2)非杓型组:共 189 例(男性 87 例,女性 102 例);(3)杓型组:共 206 例(男性 112 例,女性 94 例);(4)超杓型组:共 80 例(男性 46 例,女性 34 例)。探讨不同组别之间在收缩压、舒张压、脉压、年龄、性别、眼底动脉硬化情况;以及相关血清指标如 BUN、CRE、内皮素(ET)、NO 等方面有无显著性差异。其中根据动脉硬化程度将眼底动脉硬化分为正常、轻度、中度、重度四级。

1.2.3 统计方法

使用 SPSS 统计软件,计量资料采用方差分析,计数资料采用 χ^2 分析。对总体方差不齐者进行分别比较,剔除方差不齐的项目。

2 结果

经过统计发现不同血压曲线组之间年龄分布以及收缩压、舒张压、脉压间都有显著差异,而不同组别间性别、眼底动脉硬化情况和 BUN、CRE、ET 相比无显著差异。见表 1~4:

表 1 不同血压曲线组之间年龄、肾功能及内皮功能之间的差异

	反杓型	非杓型	杓型	超杓型
年龄	50.436 $\pm$ 12.026	49.684 $\pm$ 12.865	45.415 $\pm$ 11.995	44.600 $\pm$ 10.954
BUN(mmol/L)	13.618 $\pm$ 4.723	14.625 $\pm$ 8.802	13.909 $\pm$ 5.507	13.276 $\pm$ 4.589
CRE(mg/dl)	1.019 $\pm$ 0.195	0.978 $\pm$ 0.19	41.019 $\pm$ 0.321	0.989 $\pm$ 0.179
NO(mmol/L)	68.038 $\pm$ 28.593	74.711 $\pm$ 43.014	84.929 $\pm$ 61.219	72.531 $\pm$ 30.969
ET(mmol/L)	84.111 $\pm$ 51.649	73.926 $\pm$ 42.842	80.276 $\pm$ 47.998	78.828 $\pm$ 56.040

年龄反杓型和非杓型相近,杓型和超杓型相近,前两组与后两组之间有显著差异。其余组间无显著性差异。

表 2 不同血压曲线组之间性别的差异

	反杓型	非杓型	杓型	超杓型
男性(人)	18	87	112	46
女性(人)	21	102	94	34

不同曲线类型和性别之间无显著关系。

表 3 不同曲线组之间眼底动脉硬化程度的差异

	反杓型	非杓型	杓型	超杓型
正常(人)	9	28	43	19
轻度(人)	14	101	89	40
中度(人)	4	10	22	6
重度(人)	0	0	0	0

不同曲线组之间眼底动脉硬化程度无显著差异

表 4 不同血压曲线组之间动态血压之比较(mmHg)

	反杓型	非杓型	杓型	超杓型
24h 收缩压	135.590 ± 13.713	130.745 ± 13.903	127.689 ± 12.872	125.213 ± 11.484
白天收缩压	134.487 ± 13.463	132.201 ± 14.454	131.990 ± 13.192	130.738 ± 12.245
夜间收缩压	141.256 ± 15.444	126.095 ± 14.477	116.859 ± 12.540	105.888 ± 15.034
24h 舒张压	84.564 ± 10.617	83.810 ± 10.764	82.966 ± 9.605	80.575 ± 8.164
白天舒张压	83.974 ± 10.497	85.148 ± 10.930	85.942 ± 9.883	84.950 ± 8.083
夜间舒张压	86.513 ± 12.174	80.243 ± 10.659	74.660 ± 9.107	67.350 ± 7.383
24h 脉压	51.026 ± 9.385	47.074 ± 9.581	44.723 ± 9.116	44.638 ± 9.69
白天脉压	50.513 ± 9.489	47.053 ± 11.398	46.049 ± 9.396	45.788 ± 10.393
夜间脉压	54.744 ± 14.554	45.852 ± 11.498	42.199 ± 9.211	38.538 ± 15.079

24h 收缩压和夜间收缩压在不同组别之间有显著差异,由超杓型组至反杓型组依次升高,但以夜间最为明显。夜间舒张压、24h 脉压和夜间脉压有显著差异。均为超杓型最低,反杓型最高;白天收缩压、舒张压、脉压及全天舒张压各组间无显著性差异。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 讨论

本研究探讨了和血压昼夜节律改变相关的因素,大多和既往研究一致,个别项目有所不同。如有研究示杓型和非杓型在收缩压和脉压上无显著差异^[3],另有研究为杓型和非杓型在 BUN、CRE 上有显著差异^[4]。差别可能有以下原因:(1) 入选本研究的患者多为初诊患者,尚未发生严重并发症,因此在不同血压曲线类型之间靶器官损害并无显著差异,但不除外随着病程的进展在不同组别之间会发生分化,特别是到了疾病的晚期可能会有显著差异,这有待于继续观察。欧阳迎春等关于高血压与早期肾功能损害的研究也发现在早期 BUN 和 CRE 并未出现显著差异,仅有血、尿 β_2 -微球蛋白出现差异,和本研究一致^[5];(2) 本研究涉及的患者均未开始药物治疗或停药两周以上,故药物对血压曲线造成的影响较小;(3) 本研究对血压曲线分型的定义采用平均动脉压,和有些研究采用收缩压计算可能会稍有差异;(4) 以往研究所包括的例数较少,最多者不过一、两百例,可能在取样上有所趋向,而本研究总结例数相对较多,涵盖较广,应该更能反映出不同指标在几种血压类型之间的分布。

近年来的一些研究已初步揭示了造成高血压患者血压昼夜节律消失的内在原因。有研究认为,自主神经功能对血压的昼夜变化可起到关键性调节作用^[6]。睡眠时血中儿茶酚胺水平

降低,交感神经活性下降,血压下降。而非杓型和超杓型患者夜间血压不能如期下降的原因在于其副交感神经系统活性显著降低,血中儿茶酚胺水平升高,造成自主神经功能失调,故夜间血压下降幅度减小,造成正常的血压杓型曲线消失,使心血管系统更长时间处于较高的负荷下,加重损害。另有研究^[7]联合应用 ABPM 和 HRV 分析两项技术,观察自主神经功能的昼夜变化,发现健康人夜间副交感神经活性较高,交感神经活性最较低;白天交感神经活性较高,副交感神经活性较低,即存在着自主神经活性昼夜周期。杓型组高血压患者交感神经活性高于健康人,副交感神经活性低于健康人,但仍存在相似的自主神经活性昼夜周期。非杓型组高血压患者的交感神经活性较杓型组更高,副交感神经活性较杓型组更低,但已丧失健康人所具有的自主神经活性昼夜周期。因此非杓型组高血压患者则有更为严重的自主神经功能紊乱,夜间交感神经张力持续不降和副交感神经张力增加不显著,这是形成 24 小时血压变异曲线较平直的重要原因。

本研究示随着年龄的增加,非杓型和反杓型的比例增加,这可能与老年人自主神经调节的紊乱有关。老年人的迷走活性和压力感受体的敏感性降低,另外老年人白天活动相对较少,晚上睡眠差,加上早睡早醒和退行性变等也是造成昼夜节律紊乱的原因。

目前人们倾向于认为高血压患者正常昼夜血压节律的消失会加重靶器官的损害,对预后造成不利影响。其原因除了以上提到的夜间血压水平的持续过高,造成心血管及各个靶器官的血压负荷长期增加,因此加重其损害之外,还可从其它几个角度进行解释。(1) 本研究证实了和杓型及超杓型相比,血压曲线为非杓型及反杓型的患者的脉压,收缩压,舒张压均有很大差异,特别是脉压在杓型曲线消失的组别中明显升高,而近来已有许多研究发现过高的脉压在加重高血压患者靶器官损害方面起到了很大的作用。Safer 等^[8]及 Blacher 等^[9]的研究已证实,高血压病患者动脉顺应性减弱是动脉粥样硬化及心脑血管病独立预测因素;吴桂贤等^[10]报道,出血性卒中和缺血性卒中的发病率,随着血压和脉压的增加也增加,因此脉压 in 高血压中的作用愈来愈被人们关注。导致脉压增大原因与老龄化致组织疲劳、血管扩张、弹性减退及高血压致血管肥厚、重构与胶原累积有关,并且二者常互相促进,损伤血管并形成恶性循环。其结果可加重冠状动脉循环、脑循环等主要器官的灌注不足;增加心肌需氧量;降低应急状态冠状动脉灌注储备及使动脉壁损伤和内皮功能紊乱。引发心脑血管事件的发生。故血压节律的消失可通过脉压的变化加重靶器官的损伤。(2) 另有研究证实^[11]非杓型患者夜间 NPY 相对增高,而 NPY 反过来又通过以下机制加重了高血压进展,如直接收缩血管,促进血管平滑肌增生,提高机体对其他缩血管物质(如肾上腺素、去甲肾上腺素等)的反应性,提高血管的交感神经支配等,从而进入恶性循环。(3) 有报道示非杓型高血压血浆脂质过氧化物浓度明显升高,超氧化物歧化酶明显降低,超氧化物歧化酶/脂质过氧化物比值明显下降。表明脂质过氧化损伤及抗氧化能力在杓型与非杓型高血压之间存在显著差异,推测非杓型高血压的动脉粥样硬化易感性可能与其体内脂质过氧化损伤增强有关^[12]。(4) 昼夜节律消失的高血压病患者较昼夜节律正常者的夜间血压负荷更高。夜间血压持续升高加重 LVH,致冠状动脉血流储备更低,同时长期血管内压力升高进一步损伤血管内膜,加重动脉粥样硬化,使心肌梗死的发生率增高^[13]。

本研究结果提示,动态血压监测对高血压病患者血压节律的分析十分重要。在指导临床

方面有以下意义:(1)能够作为高血压患者预后的预测因子,甚至可成为危险度分层的参考因素。对昼夜节律消失的高血压患者要加以重视,严密观察,并尽可能用药物加以逆转,以避免多种并发症的出现。(2)指导治疗。由于血压昼夜节律的消失会带来多种不利,故进行药物治疗时除了要达到有效降压和平稳降压以外,还应同时注意对自主神经紊乱的纠正及药物对血压昼夜节律的影响,最好能够选用能逆转昼夜节律的药物,重视其对夜间过高血压的抑制作用,恢复正常的血压曲线,延缓多种并发症的进展。

参考文献

- [1] Guidelines Subcommittee. 1999 World Health Organization International society of hypertension guidelines for the management of Hypertension [J]. hypertension, 1999, 17: 151-183
- [2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 258-270.
- [3] 徐新娟, 刘建华等. 原发性高血压患者脉压与血压昼夜节律分析 新疆医科大学学报, 2002 Sep. , 25(3): 261-263
- [4] 孟秋云等. 高血压病患者血压昼夜节律改变与高血压肾损害的关系分析. 临床内科杂志 2002年7月第19卷第4期: 273-275
- [5] 欧阳迎春等. 原发性高血压“杓型”与“非杓型”者动态血压变异性与早期肾功能损害的临床研究. 泸州医学院学报 2001年第24卷第4期: 286-287
- [6] Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, et al. Gender, daynight blood pressure changes, and left ventricular mass in essential hypertension; dieters and perkers. Am H Hypertens, 1995, 8: 193
- [7] 魏希有等. 杓型与非杓型高血压患者自主神经功能紊乱的比较. 泰山医学院学报 Vol. 22 No. 2 2001: 88-91
- [8] Safar ME, London GM, Asmar R, et al. Recent advances on large arteries in hypertension [J]. Hypertension, 1998, 32: 156-161.
- [9] Blacher J, Pailin B, Guerin AP, et al. Carotidarterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease [J]. Hypertension, 1998, 32: 570-574
- [10] 吴桂贤, 吴兆苏, 刘静, 等. 人群脉压分布特征的研究[J]. 中华心血管病杂志. 2001, 29(7): 436-440.
- [11] 周方兴等. 药物干预非杓型高血压者恢复杓型血压昼夜节律后对血浆神经肽 Y 的影响. 临床心血管病杂志 2002年6月第18卷第6期: 245-247
- [12] 石岱等. 杓型与非杓型高血压的脂质过氧化水平. 中国动脉硬化杂志 2001年第9卷第3期: 249-250
- [13] 彭江等. 高血压病患者血压昼夜节律与左室肥厚及心肌缺血之间的关系探讨. 重庆医学 2001年9月第30卷第5期: 413-415

糖耐量低减者脑血管病变的临床分析

宣武区白纸坊医院 100054

冯金玉 王连成 张燕

摘要:目的 探讨糖耐量低减者的脑血管损伤情况及其临床意义。方法 对 50 例糖耐量低减者进行经颅超声多普勒(TCD)检查,与对照组就脑血管平均血流速度(Vm)、脉动指数(PI)及所检出的异常血管数目等参数结果进行比较分析。结果 TCD 显示糖耐量低减组的 PI 值、Vm 值均高于正常对照组,脑血管病变发生率为 20.91% ($P<0.001$)。结论 糖耐量低减者存在脑血管的损伤,防治糖尿病及其脑血管并发症,应始于糖耐量低减期。

关键词:糖耐量低减;超声波;多普勒;经颅

Clinical Analysis of Cerebral Hemodynamic changes in Impaired Glucose Tolerance Patients

Feng Jinyu, Wang Liancheng, Zhang Yan.

BaiZhiFang Hospital

XuanWu District, Beijing (100054)

Abstract: **Objective** To evaluate damage condition and clinic sense of cerebral hemodynamic changes in impaired glucose tolerance (IGT) patients. **Method** TCD was used to measure the mean blood flow velocity (Vm), pulse index (PI) and check amounts of abnormality blood vessel whose parameter result was compared analyse in 50 cases IGT and healthy compared group. **Results** The incidence of cerebral hemodynamic changes detected with TCD was 20.91% ($P<0.001$). The PI, Vm count in IGT group must higher than that in healthy compares. **Conclusion** Being cerebrovascular changes in IGT patients. Prevention and cure the diabetes mellitus and its complication of cerebral hemodynamic changes must begin in IGT stage.

Key words: Impaired Glucose Tolerance Ultrasonic Doppler Transcranial

糖耐量低减(IGT)是糖尿病的前期状态,是发展为 2 型糖尿病和脑血管病的高危因素。有学者曾利用经颅多普勒检查发现糖尿病合并脑血管病变的发生率高达 37.43%~53.8%^[1,2]。为探讨糖耐量低减时脑血管的损伤程度,本文对 50 例糖耐量低减者进行 TCD 检查并分析其临床意义,旨在探讨预防和治疗糖耐量低减的必要性。

1 资料与方法

1.1 对象

选择我院 2002 年 1 月~2003 年 4 月体检中发现的糖耐量低减者 50 例,其中男性 21 例,女性 29 例,年龄 35~60 岁(46.80 ± 6.93 岁)。体重指数 19.04~27.68(23.78 ± 3.21)。总胆

固醇(TC)3.05~5.33 mmol/L(3.97 ± 0.65 mmol/L),甘油三酯(TG)0.52~2.78 mmol/L(1.64 ± 0.81 mmol/L),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)1.67~3.65 mmol/L(2.90 ± 0.54 mmol/L),高密度脂蛋白胆固醇(HDL)0.71~1.59 mmol/L(1.32 ± 0.39 mmol/L)。IGT 诊断符合 1997 年美国糖尿病协会的诊断标准。除外脑血管病(脑梗塞、脑出血、TIA)冠心病及高血压病,除外服用影响糖耐量药物者、超声窗太小者及颅底动脉变异明显者。正常对照组 40 例,男性 20 例,女性 20 例,年龄 36~60 岁(47.78 ± 7.18 岁)。体重指数 18.37~27.84(23.12 ± 3.16)。TC 2.96~5.35 mmol/L(3.94 ± 0.61 mmol/L),TG 0.56~2.77 mmol/L(1.59 ± 0.79 mmol/L),LDL-C 1.60~3.63 mmol/L(2.88 ± 0.52 mmol/L),HDL 0.76~1.57 mmol/L(1.36 ± 0.34 mmol/L)。均为健康体检者。两组年龄、血脂四项及体重指数差异无显著性。

1.2 方法

经颅超声多普勒检查由 TCD 室专人操作。采用美国 MET 电子公司生产的 MT-1000 A TCD 仪。受试者于检查前静卧 10~15 min,使用 2.0 MHz 脉冲波探头于平卧位经颞窗检查大脑中动脉(MCA)大脑前动脉(ACA)及大脑后动脉(PCA),坐位头略前倾经枕窗探测基底动脉(BA);椎动脉(VA);4.0MHz 连续波探头检测颅外的颈内动脉(ICA)起始段。记录各动脉收缩期峰速度(Vs)、舒张末期流速(Vd)、平均血流速度(Vm)及脉动指数[PI,PI=(Vs-Vd)/Vm]。TCD 仪自动报出所检参数记录供分析用。

1.3 血管狭窄的 TCD 诊断标准

符合实用经颅多普勒超声学中血管狭窄的诊断标准^[3]。

1.4 统计学方法

两组间比较计量资料采用 t 检验,计数资料采用 X^2 检验。

2 结果

2.1 两组狭窄血管数目比较(表 1)

由表 1 可见,糖耐量低减组脑血管狭窄数目占 20.91%(115/550),其中轻度血管狭窄者占 12.36%(68/550),中度血管狭窄者占 5.64%(31/550),重度血管狭窄者占 2.91%(16/550)。IGT 组脑血管狭窄数目与对照组相比差异显著($P < 0.001$)

表 1 两组狭窄血管数目比较(条)

组别	条数	正常	构成比 %	轻度血管 狭窄	构成比 %	中度血管 狭窄	构成比 %	重度血管 狭窄	构成比 %
糖耐量 低减组	550	435	79.10	68	12.36	31	5.64	16	2.91
对照组	440	408	92.93	16	3.64	9	2.05	7	1.59

2.2 两组各检测血管的 Vm 值比较(表 2):

表 2 糖耐量低减组与对照组各检测动脉 Vm 的结果

组别	例数	ICA	MCA	ACA	PCA	VA	BA
糖耐量低减组	50	$55.9 \pm 12.1^*$	$58.6 \pm 14.3^*$	49.8 ± 11.2	50.9 ± 12.7	40.5 ± 9.6	$47.4 \pm 9.6^*$
对照组	40	51.7 ± 10.2	52.9 ± 12.2	51.2 ± 9.7	49.6 ± 9.9	39.1 ± 8.9	43.3 ± 9.2

注: * $P < 0.05$

由表 2 可见糖耐量低减组 ICA、MCA、BA 的 V_m 值均高于正常对照组,经统计学分析,差异有显著性。而 ACA、PCA、VA 的 V_m 值与对照组相比无明显差异。

2.3 糖耐量低减组与对照组各检测动脉的 PI 值比较(见表 3):

表 3 糖耐量低减组与对照组各检测动脉 PI 的结果

组别	例数	ICA	MCA	ACA	PCA	VA	BA
糖耐量低减组	50	1.02 ± 0.17	0.99 ± 0.20	1.01 ± 0.21	1.02 ± 0.18	0.94 ± 0.19	0.98 ± 0.19
对照组	40	0.92 ± 0.11	0.88 ± 0.12	0.90 ± 0.11	0.91 ± 0.10	0.83 ± 0.14	0.89 ± 0.10

由表 3 可见,糖耐量低减组的各检测动脉的 PI 值增高,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.001$)。

3 讨论

糖耐量低减(IGT)是介于正常血糖和糖尿病之间的一种代谢异常状态,是糖尿病自然病程中的一个重要阶段。糖尿病所致脑血管损害始于 IGT 期^[4,5]。血糖维持在 IGT 范围,患者一般不易发生糖尿病微血管病变,但大血管病变发生的危险性显著增加^[6]。本研究显示:IGT 组脑血管病变发生率为 20.91%,明显高于正常对照组。其病变性质以脑血管轻度狭窄为主,占狭窄总数的 59.13%。IGT 引致大血管病变增高的原因,除 IGT 常和其它致动脉硬化因素并存外,IGT 还可直接导致内皮细胞层的通透性增加。使血循环内容物,如白蛋白漏出,引起大血管间质水肿,导致细胞增生及基质产生过多。IGT 还可以使舒血管的一氧化氮释放减少,缩血管的内皮素分泌增多,促使血管收缩^[5],从而导致血管狭窄。

经颅超声多普勒检查对糖尿病脑血管损伤有较高的敏感性,可间接反映脑血管功能和形态改变,对于脑血管痉挛、狭窄、闭塞及脑动、静脉畸形等具有重要的诊断价值。有学者对糖耐量低减者和糖尿病初诊者进行颈动脉超声波检查,结果显示颈动脉存在管腔狭窄^[4,5]。 V_m 是反映动脉管径大小的重要参数,当 V_m 高于正常值时,表明管腔已出现狭窄。本研究结果显示糖耐量低减组 ICA、MCA、BA 的 V_m 值均高于正常对照组,而 ACA、PCA 及 VA 的 V_m 值无明显变化。提示在糖尿病前期 ICA、MCA、BA 已存在脑血管狭窄的病理改变。其 ICA、BA 的 V_m 值增高机制,可能与糖尿病者 ICA、BA 易于遭受损害有关^[7]。而 MCA 在颅内动脉中血流速度最快,可能与其血管容易受损有关,其确切机制尚待进一步研究。

胰岛素抵抗是启动糖耐量异常病理生理过程的使动因素,IGT 时存在胰岛素抵抗,胰岛素抵抗所致的高胰岛素血症是血管硬化的独立危险因素,胰岛素可直接促进血管平滑肌细胞增生,参与血管硬化的病理过程^[8]。TCD 中的 PI 值是反映血管顺应性和弹性的重要指标,从而可以间接反映脑动脉的硬化情况。本研究中 IGT 组的 PI 值均明显高于正常对照组,表明糖耐量低减者的脑血管顺应性和弹性均有不同程度的下降,且病变范围较为广泛,包括颈内动脉系统和椎基底动脉系统,提示糖耐量低减时已存在较为广泛的脑动脉硬化。

综上所述,防治糖尿病及糖尿病所致的血管病变,应始于 IGT 期,甚至于更早阶段。在 IGT 时必须给予积极干预和治疗,减少高热量与饱和脂肪酸食物的摄入、增加体力活动、减少肥胖或超重,尤其是腹腔脂肪的堆积,必要时给予药物治疗,如双胍类(二甲双胍)、噻唑烷二酮

类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等。改善胰岛素抵抗,减少肠道葡萄糖吸收、抑制肝糖原异生、改善糖耐量,并降低体重和血压,在一定程度上改善脂代谢等,以减少糖尿病及脑血管病的发病率。

参考文献

- [1] 冯烈,徐安定,李洁璠. 经颅多普勒超声对糖尿病患者脑血管病变的诊断价值. [J]. 中华内分泌杂志,1999,10(2):86~88.
- [2] 李玉荣,金秀平,刘斌. 糖尿病患者的经颅多普勒超声检测及临床分析. 临床荟萃,2003,18(3):129~131.
- [3] 焦德明,主编. 实用经颅多普勒超声学. 第1版. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995. 207~208.
- [4] Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Leonhardt W, et al. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. Diabetes Care, 1999, 22: 333~338.
- [5] 傅茂,傅祖植. 糖耐量减低的危害及其机制. [J]. 中华内分泌代谢杂志,2002,18(1):78~79.
- [6] 叶山东综述:糖耐量减低的研究进展. 国外医学内科分册,2002,29(9):385~387.
- [7] Yasaka M, Yamaguchi T, Shichiri M. Distribution of atherosclerosis and risk factors in atherothrombotic occlusion. Stroke, 1993, 25: 663~673.
- [8] 李慧丽,黄定九,赵倩,等. 胰岛素对血管平滑肌细胞转化生长因子 β_1 及其受体表达的影响. [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(1): 24.

SYBR Green I PCR 检测人类白细胞 抗原-DRB1 * 12

李军燕 李金明^①

摘 要:目的 用 SYBR Green I 聚合酶链式反应(PCR)方法对人类白细胞抗原(HLA)-DRB1 * 12 位点进行检测,研究建立一种新的 HLA 基因分型方法。方法 收集 1 份已知 HLA-DRB1 * 12 的标本和 12 份未知型别的临床标本,采用序列特异引物,利用荧光染料 SYBR Green I 进行扩增,通过检测荧光信号确定型别。SYBR Green I 可与双链 DNA 结合,产生荧光。荧光信号的增加依赖与扩增产物的积累。结果 12 份标本的扩增产物的经熔解曲线分析,有 3 份标本为 DRB1 * 12,产物用离心柱纯化后,进行 DNA 直接测序,结果证实为 DRB1 * 12 阳性。结论 SYBR Green I PCR 操作简便,结果准确,可成为一种 HLA 基因分型的新方法。

关键词:HLA, DRB1, SYBR, Green, 基因分型; 熔解曲线

Abstract: Objective Detect the HLA-DRB1 * 12 using SYBR Green I PCR to develop a new genotyping method for HLA. **Methods** 1 HLA-DRB1 * 12 sample and 12 unknown clinical sample were collected. The typing of these samples were determined by PCR, which includes a fluorescence dye, SYBR Green I, and the sequence specific primer. SYBR Green I could binds to the dsDNA to exhibit fluorescence. The fluorescence enhancement depends on the accumulation of the amplified product. **Results** 3 of the 12 unknown sample is proved to be DRB1 * 12 by the analysis of the melting curve of the amplified products. After purification, the type of these products were confirmed DRB1 * 12 by DNA-based sequencing. **Conclusions** The results of SYBR Green I PCR demonstrate that it can be a new strategy for HLA typing because of its convenience and accuracy.

key words: HLA, DRB1, SYBR, Green, genotyping; melting curve

SYBR Green I 是一种荧光染料,与双链 DNA 结合后,能产生增强的荧光信号。在 Gene Amp 5700 扩增仪或 Roch Lightcycler 扩增仪上,SYBR Green I 的荧光可以被实时检测^[1-6]。近年来器官移植在世界乃至我国广泛开展,快速准确地完成临床移植 HLA 分型,是确保器官移植成功至关重要的环节。本实验利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合发射荧光的特性,将其用于实时荧光 PCR 检测,以 HLA DRB1 * 12 位点为例,进行 HLA 分型。

材料和方法

1. 标本:HLA-DRB1 * 12 阳性样本,经 PCR-SSP 证实。(采自北京红十字朝阳医院泌尿科门诊病人)12 份未知 HLA 型别的临床样本,随机抽取自中国中医研究院广安门医院住院病人。

^① 作者单位:100053 北京,中国中医研究院广安门医院(李军燕);卫生部北京医院卫生部临床检验中心(李金明)

2. 试剂和仪器:SYBR Green 试剂盒(美国 ABI 公司),UNIQ 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工生物技术有限公司),NaI(6mol/l)、氯仿、异戊醇(北京化学试剂有限公司),琼脂糖(spain)、EB、DNA marker pBR322/Msp I(华美生物工程公司),HLA DRB1 * 12 引物(上海生工生物技术有限公司合成)。Gene Amp 5700 扩增仪(美国 ABI 公司),HV 3000 多用电泳仪(北京东方特力科贸中心),紫外透射分析仪(北京仪诚科技公司),万分之一电子天平(Mettler AE160)。

3. DNA 提取:用微量全血 NaI 法对已知 HLA DRB1 * 12 阳性的标本和未知 HLA-DRB1 型别的临床样本进行核酸提取。方法参考文献^[7]。

4. PCR 反应条件的设定及优化:上游引物 5' AGTACTCTACGGGTGAGTGTT 3'下游引物 5'CACTGTGAAGCTCTCCACAG 3',参照文献^[8]设计。应用 ABI 公司 SYBR Green I 试剂盒。总反应体积 50 μ l。反应体系:10 $\times$ SYBR Green buffer 5 μ l, MgCl₂ (1.5 mmol/L), dNTP(dUTP)(200 μ mol/L),上下游引物各 0.5 μ mol/L, UNG 2 μ , Taq 酶 2.5 μ , 无菌双蒸水 35.5 μ l, 循环条件:50 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。以此条件为基础,应用已知 HLA DRB1 * 12 阳性的标本对 Mg²⁺ 浓度, Taq 酶浓度, 退火温度等进行优化选择。MgCl₂ 以 1.5 mmol/L 为基础,以 0.3 mmol/L 为单位分别递增或递减一系列单位,选择最适合的浓度。Taq 酶以 2.5 μ 为基础,递减几个 0.5 μ 。

5. 临床标本的测定:运用优化后的条件,对 12 份临床未知 HLA DRB1 型别的标本进行测定。每次实验均同时以无菌双蒸水代替模板作为无模板对照(NTC)。由于 SYBR Green I 可同 DNA 双链非特异结合,因此 PCR 扩增过程中产生的非特异性产物、引物二聚体等也可同 SYBR Green 结合而产生荧光,形成扩增曲线。所以扩增时应用 Dissociation 程序,以扩增产物的熔解曲线进行结果的判定。

6. PCR 产物测序:为进一步证实反应结果,特将 PCR 反应产物经离心柱纯化,(操作按说明书)纯化后产物送上海基康生物技术有限公司进行产物直接测序。测序引物同 SYBR Green I PCR 引物。

结 果

1. PCR 反应条件的设定和优化:退火温度的选择:我们应用 DRB1 * 12 的序列特异引物,最适退火温度理论计算值为 61.0 $^{\circ}$ C,为提高扩增反应的特异性,我们增加到 63.0,此时扩增效率和特异性均较好(未显示扩增曲线)。Mg²⁺ 浓度的选择:我们设定一系列 Mg²⁺ 浓度,发现在我们的实验中 Mg²⁺ 从 1.2 mmol/L, 1.5 mmol/L 到 2.0 mmol/L,对试验结果没有明显的影响。为试验方便和资源的节约,选择 1.5 mmol/L。Taq 酶用量:本试验采用的 Taq 酶用量分别是 1.5 μ , 2 μ , 2.5 μ 。结果表明 Taq 酶 2 μ /反应已能保证扩增的效率和特异性,对有条件的实验室来说应该是既节约资源又保证实验结果的选择。但是,由于目前我国临床检验的实验室使用的微量加样器规格一般是 0.5 μ l~10 μ l,而一般试剂厂家提供的 Taq 酶浓度为 5 μ / μ l,所以实验时要加 Taq 酶 0.4 μ l,这就超出了加样器的量程范围,加样不准确。因此我们选择 Taq 酶用量 2.5 μ /反应。

2. 反应结果的熔解曲线判定:由于 SYBR Green I 可与双链 DNA 非特异性结合,所以扩

增过程中产生的非特异性产物、引物二聚体等均可与其结合而发出荧光。本实验中设立的 NTC 也都形成了类似的扩增曲线。DRB1 阳性标本做复管测定,形成明显的特异扩增曲线,在第 33 个循环时,2 份 NTC 亦生成扩增曲线。

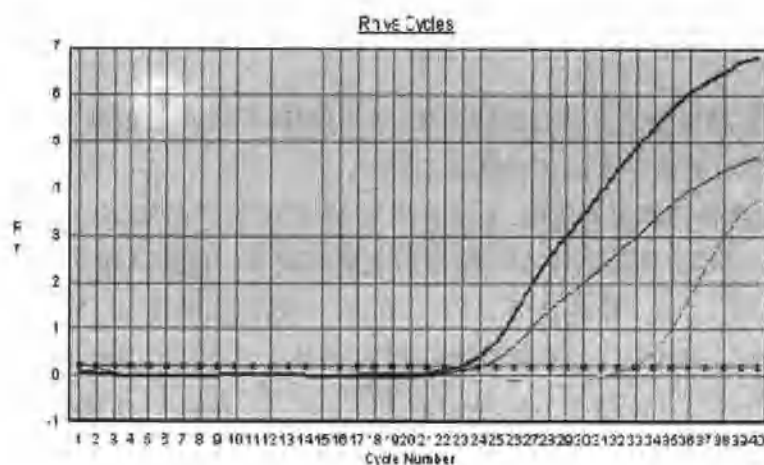


图 1 阳性样本和 NTC 的扩增曲线

应用 Dissociation 程序,通过分析扩增产物的熔解曲线可将特异产物和非特异产物、引物二聚体区分开。2 份阳性标本,其产物的熔解曲线峰值在 88.4℃,且由于是特异扩增产物,熔解温度均一,峰的形状比较锐利。而 2 份 NTC 的扩增曲线也有一主峰,峰形较宽,熔解温度低于特异扩增产物,为 76.4℃,推测由引物二聚体形成。两种曲线很易区分。

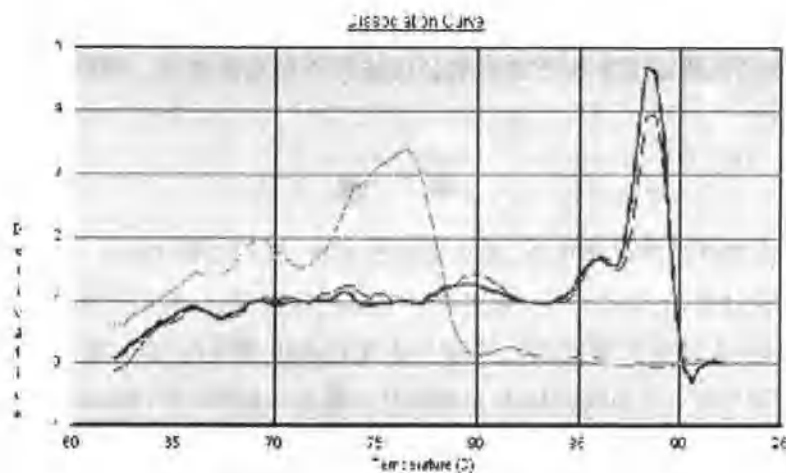


图 2 阳性样本和 NTC 的熔解曲线

3. 临床样本的检测:应用优化后的 SYBR Green I PCR 反应条件,对 12 份临床样本进行 HLA DRB1 * 12 检测。将扩增曲线和熔解曲线相结合判断结果。12 份样本中有 3 份样本形成了特异扩增曲线,熔解曲线峰值与同批测定的阳性对照相同,判定为 HLA-DRB1 * 12 阳

性。另有 4 份样本在约第 33 个循环处也有扩增,但熔解曲线与 NTC 类似,判定为非特异性扩增。

4. DNA 测序结果:3 份 SYBR Green I PCR 判定阳性的临床标本测序结果经 Genbank Blast 程序比对,全部确认为 HLA - DRB1 * 12 序列,证实标本 SYBR Green I PCR 检测的分型结果与测序结果一致。(NTC 和其余标本的扩增产物纯化后没有 DNA 条带,因此未进行测序)

讨 论

SYBR Green I 是一种结合于 DNA 小沟的荧光染料,同双链 DNA 有很高的亲和力。当它与双链 DNA 结合后,能产生增强的荧光信号。SYBR Green I 在 485 nm 波长处被激发,发射荧光波长 520 nm。在 ABI 公司的 5700 扩增仪等荧光扩增仪中,机器在每个热循环的复性或复性/延伸期采集荧光信号。荧光信号随着 PCR 进程与不断生成的 PCR 产物成正比。这样就形成了荧光扩增曲线。荧光强度的增加有赖于反应液中原始模板的浓度,因此还可进行靶核酸的定量检测^[1-6]。

由于 SYBR Green I 与双链 DNA 的这种结合是非特异性的,在 PCR 过程中可能产生的非特异产物、引物二聚体等都会形成类似的扩增曲线,因此必须有好的方法对结果的特异性进行判定。ABI 公司的 5700,7700 扩增仪,ROCH 公司的 Lightcycler 扩增仪均设有对反应产物的熔解曲线进行分析的程序。每种扩增产物的熔解曲线依赖于它的 GC 含量、链的长度、序列组成、反应中 Mg^{2+} 浓度等因素。非特异产物片段长短不一,大小有很宽的范围;特异扩增产物及引物二聚体则不同,它们有确定的大小。引物二聚体片段较小,熔解温度也较低。这种 DNA 片段长度的差异导致了最大重结合速率温度(即熔解曲线图中波峰对应的温度)的差异。因此可以根据产物的熔解曲线将特异性反应产物与非特异产物、引物二聚体区分开来^[1-6]。

近年来,基于 Taqman 技术的荧光 PCR 方法广泛应用于病原体、等位基因的检测中。这种 PCR 方法可进行实时定量检测,也无需扩增后的产物分析过程,由于运用特异荧光探针,因而有很高的敏感性和特异性。但是对于每种待检测的序列都需要花费时间和财力研究设计合成荧光探针,尤其对 Taqman 探针需进行双标记,技术上就更为困难,价格也较为昂贵。相对于 Taqman,SYBR Green I PCR 不需要设计合成荧光探针,简化了设计思路,价格也相对便宜。结合熔解曲线分析,能保证 SYBR Green I PCR 反应的特异性。近来国外报道这种方法应用于病原体的检测,单核苷酸多态性的研究。但它的的一个很大不足之处在于不能象 Taqman 方法那样标记不同的荧光基团,在一个反应管里实现多种靶序列的检测^[6]。

目前临床器官移植前的 HLA - I 类抗原的配型仍以血清学方法为基础,HLA - II 抗原 DRB1 的配型主要采用 PCR-SSP 方法。这种方法操作简便,结果准确,但需要扩增后进行凝胶电泳,不仅延长了检测时间,而且容易造成实验室污染^[9,10]。本实验以 DRB1 * 12 位点为例,探索建立一种新的 HLA-DRB1 分型方法。仍采用序列特异引物,但使用荧光染料 SYBR Green I 进行扩增,实现了反应的实时监测,缩短检测时间,简化了操作步骤,而且不需要扩增后的分析过程,大大减少了产物污染的可能。本实验检测 12 份未知临床样本,有 3 份为 DRB1 * 12 阳性,与 DNA 测序结果一致。

参考文献

- [1] Dhar AK, Roux MM, Klimpel KR, et al. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2835-2845.
- [2] Aldea C, Alvarez CP, Folgueira L, et al. Rapid detection of herpes simplex virus in genital ulcers by real-time PCR using SYBR Green dye as the detection signal. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 1060-1062.
- [3] Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem*, 2000, 46: 1738-1743.
- [4] Bohling SD, King TC, Wittwer CT, et al. Rapid simultaneous amplification and detection of the MBR/JH chromosomal translocation by fluorescence melting curve analysis. *Am J Pathol*, 1999, 154: 97-103.
- [5] Szuhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, et al. A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SYBR Green and molecular beacon polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1651-1660.
- [6] Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, et al. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 2001, 25: 430-442.
- [7] 郑怀竞. 主编. 临床基因扩增实验指南. 北京: 北京医科大学出版社, 1999, 32-33.
- [8] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 1992, 39: 225-235.
- [9] 姜军平. 主编. 实用PCR基因诊断技术. 第一版. 世界图书出版公司, 1996. 51-57.
- [10] 曹孟德. 主编. HLA分子生物学及临床应用. 第一版. 河南: 河南医科大学出版社, 1998. 280-284.