

# ESR 及 CRP 在兔脊柱结核模型构建中的变化规律研究

岳学锋<sup>1</sup>, 王 鹏<sup>1\*</sup>, 施建党<sup>2</sup>, 赵 晨<sup>1</sup>, 苏胜杰<sup>1</sup>, 杨宗强<sup>1</sup>, 何 胤<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察红细胞沉降率 (ESR) 及 C 反应蛋白 (CRP) 在新西兰兔脊柱结核模型构建中的变化规律。方法

45 只新西兰兔随机分为造模组 ( $n=25$ )、对照组 ( $n=20$ )。造模组于腰 4、5 椎间隙钻孔, 填入明胶海绵, 在其中浸注 H37Rv 结核标准菌株混悬液 0.1 ml; 对照组浸注生理盐水 0.1 ml。观察实验兔一般状况, 并通过影像学、病理学、微生物学评估造模情况; 观察两组实验兔术前、术后 (1、3、5、7、10、14、28、42、56 d) 不同时间点 ESR 及 CRP 的变化规律; 探讨 ESR 及 CRP 与兔脊柱结核感染的相关性。结果 术后 56 d 造模组 21 只实验兔最终完成实验, 对照组为 18 只。通过影像学、病理学、微生物学评估: 造模组脊柱结核造模感染阳性率为 76.19% (16/21), 造模阳性兔均至少符合一项造模阳性判定标准; 造模组另 5 只造模阴性兔及对照组实验兔均无阳性发现。动态观察两组 ESR、CRP 的变化规律: 造模组阳性兔体内的 ESR、CRP 变化规律与造模组阴性兔明显不同, 而造模组阴性兔体内的 ESR、CRP 变化规律与对照组相似; 造模组阳性兔术后 ESR 及 CRP 迅速升高, ESR 术后第 7 天达到高峰, CRP 术后 5 d 达高峰, 至术后 42 d 已趋于平稳, 术后 56 d 处死动物时 ESR 及 CRP 仍维持在较高水平; 造模组阴性兔及对照组实验兔 ESR 在术后第 7 天达高峰, 此后逐渐下降, 至术后 42 d 已降至术前水平, CRP 术后第 3 天达高峰后逐渐下降, 至术后 28 d 降至术前水平; 造模组阳性兔 ESR、CRP 达高峰时所测值及实验结束时 (56 d) 所测值均高于造模组阴性兔和对照组同时时间点所测值 ( $P < 0.05$ ); 绘制术后 56 d 时 ESR、CRP 与结核造模感染相关性的 ROC 曲线, 曲线下面积: ESR 为 0.953, CRP 为 0.927, 均显著大于 0.5, 以 Youden 指数最大的切点为最佳筛选点计算: ESR 最佳筛选点为 7.5 mm/h, CRP 最佳筛选点为 5 527.50  $\mu\text{g/L}$ 。结论

ESR 及 CRP 可反映模型兔体内结核菌感染情况及病情进展, 造模术后 56 d 检测值可作为筛选兔脊柱结核动物模型的可靠指标。

**关键词** 脊柱结核; 动物模型; 兔; 红细胞沉降率; C 反应蛋白

中图分类号 R 681.5; R 322

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0833-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.012

新西兰兔脊柱结核模型作为目前较理想的脊柱结核动物模型, 在阐明结核分枝杆菌在病灶局部增殖致病的机制、细菌在宿主内持续存活的机制以及新药研发、手术方式改进和骨修复重建材料研究等方面具有重要的应用价值。目前尚缺乏评价兔结核分枝杆菌感染造模是否成功以及模型体内结核菌感染情况、病情进展和是否治愈的评价标准<sup>[1-4]</sup>。红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) 和 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是反映炎症反应和组织损伤程度的非特异性标志物, 是临床上监测早期感染、病情进展及术后复发的重要指标, 但 ESR 和 CRP 作为评价兔脊柱结核模型的研究国内外尚未见报道。该研究构建新西兰兔脊柱结核动物模型, 动态观察 ESR 和 CRP 在体内的变化规律, 旨在为脊柱结核动物模型的筛选与评价以及模型体内评价新药新材料的疗效建立新的快捷、可靠的标准。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 10% 甲醛溶液 (重庆化学试剂厂); 2% 戊巴比妥钠溶液、PBS 磷酸盐缓冲液 (美国 Sigma 公司); 人型结核分枝杆菌标准株 H37Rv (北京生物制品研究所); 兔血清 CRP ELISA 酶联免疫试剂盒 (江苏镇江厚普生物科技有限公司); 2% 利多卡因 (浙江诚意药业有限公司)。

**1.2 结核杆菌的培养基扩增** 首先将结核分枝杆菌 H37Rv 在 Lowenstein-Jensen 固体斜面培养基培养扩增 3 周至对数生长期。然后用无菌“L 型”玻璃棒采集“菜花”样菌落并用玻璃研磨器将其研磨混匀于无菌 0.9% 氯化钠溶液中。悬浮液经 5  $\mu\text{m}$  无菌滤器过滤, 将细菌密度调整到  $1 \times 10^7$  CFU/ml。经 Lowenstein-Jensen 固体斜面培养基培养计数, 将混悬液分装冻存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  低温冰箱备用。

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81360275); 宁夏自然科学基金 (编号: NZ13131); 宁夏医科大学重点项目 (编号: XZ2015015)

作者单位: <sup>1</sup> 宁夏医科大学研究生学院, 银川 750004

<sup>2</sup> 宁夏医科大学总医院脊柱骨科, 银川 750004

作者简介: 岳学锋, 男, 主治医师, 硕士研究生;

施建党, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shi\_jiandang@163.com

\* 对本文具有同等贡献

**1.3 实验动物分组及处理** 选取经结核菌素纯蛋白衍生物(5 IU)皮试试验检测筛选为阴性的健康新西兰大白兔 45 只(宁夏医科大学实验动物中心),雌雄不限,2.5~2.8 kg。控制相对湿度在 60%~80%,日光(12/12 h)昼夜循环,温度控制在 21~25℃。实验动物分笼隔离饲养并标序,笼具及实验所需饮用水、食料均经灭菌处理后按标准方式给予饲养,并容许实验用兔自由进食及饮水。在每一个时间点执行的操作之前,兔均禁食过夜,然后给予麻醉。新西兰兔分为:造模组 25 只,对照组 20 只。造模组于腰 4、5 椎间隙钻孔,填入明胶海绵,在其中种植 H37Rv 结核标准菌株混悬液 0.1 ml,对照组浸注生理盐水 0.1 ml。

**1.4 术后观察及标本检测**

**1.4.1 一般情况观察** 术后每日观察实验兔活动、精神及进食情况,伤口有无红肿、感染、脓疡。

**1.4.2 造模情况评价及观察** 本研究中,对新西兰兔脊柱结核模型成功与否的判定在术后第 56 天进行(此时结核杆菌在病灶局部增殖,骨破坏模型已趋于完善)<sup>[3]</sup>。判断标准采用影像学(X 线片/CT/MRI)、病理学及微生物学进行综合评定,对各指标的观测、数据的收集和结论的判断均在“盲法”设计下进行,若有下述一项,则视为兔脊柱结核菌感染造模阳性(即造模成功),反之为阴性(即造模失败)。

**1.4.2.1 影像学判断标准** 各组实验兔于造模后 56 d 行 X 线片、CT 及 MRI 检查,观察椎间盘及椎体破坏、脓肿形成情况。若有一种影像学检查提示有典型结核性骨质破坏征象(椎间隙变窄,相邻椎体破坏,椎体边缘性、虫蚀样破坏)即视为造模阳性。

**1.4.2.2 病理学判断标准** 术后 56 d 处死实验兔,无菌操作下解剖观察各组腰椎椎体、椎间盘感染节段的改变以及椎旁脓肿等情况,常规行 HE 染色,观察组织病理学改变,若有脓肿、结核性肉芽肿、干酪样坏死物质、死骨、死腔形成等典型结核破坏病理学表现则视为造模阳性。

**1.4.2.3 微生物学判断标准** 术后 56 d,无菌操作下吸取破坏区的脓液及组织匀浆 0.5 g,经前处理后置入培养瓶中,含标本的液体培养基置 BacT/ALERT 3D 孵育箱内,37℃ 恒温培养 6 周,期间观察培养仪指示结果,若培养阳性,则视为造模阳性。

**1.4.3 标本收集及样本中 ESR 及 CRP 的测定**

**1.4.3.1 标本收集及处理** 术前、术后(1、3、5、7、10、14、28、42、56 d)通过耳缘静脉采集每只实验兔

3.6 ml 静脉血,其中 2 ml 静脉血用离心机离心 2 次(3 000 r/min,5 min),取上清液应用兔血清 CRP ELISA 试剂盒测定血清 CRP,另外 1.6 ml 静脉血立即用血沉检测仪检测 ESR(采样后 30 min 检测值)。

**1.4.3.2 标本中 CRP 的浓度测定** 在酶标包被板上设标准品孔 10 个,对标准品进行稀释与加样,绘制标准曲线(图 1);在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl,然后再加待测样品 10 μl;用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 min;揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复 5 次,拍干;除空白孔外,每孔均加入酶标试剂 50 μl;再次进行温育、洗涤;每孔先加入显色剂 A 50 μl,再加入显色剂 B 50 μl,轻轻震荡混匀,37℃ 避光显色 15 min;每孔加终止液 50 μl 终止反应;以空白孔调零,于 450 nm 波长处依序测量各孔的吸光度值(optical density value, OD 值)。

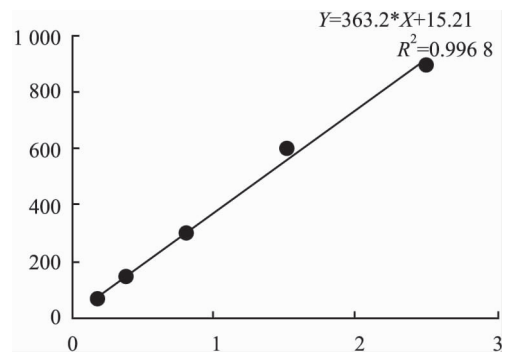


图 1 CRP 标准曲线

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料采用 *t* 检验,ESR 与 CRP 的最佳阳性筛选标准通过 ROC 曲线的筛选点来决定, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 实验动物一般情况** 除对照组 1 只实验兔因麻醉意外死亡外,余实验动物均麻醉恢复顺利。造模组:1 只实验兔术后进食饮水差,于术后 8 d 死亡;1 只实验兔术后 28 d 时切口仍未愈合,出现流脓及截瘫,故淘汰;2 只实验兔因进食欠佳、消瘦、截瘫分别至术后 35 d 及 42 d 时死亡,解剖发现胸、腹腔内有大量脓液。对照组:1 只实验兔 14 d 术后切口红肿、渗液,换药后仍无好转,故淘汰。其余存活实验兔术后情况及切口愈合良好。

**2.2 造模情况评价及观察** 至实验结束时(术后

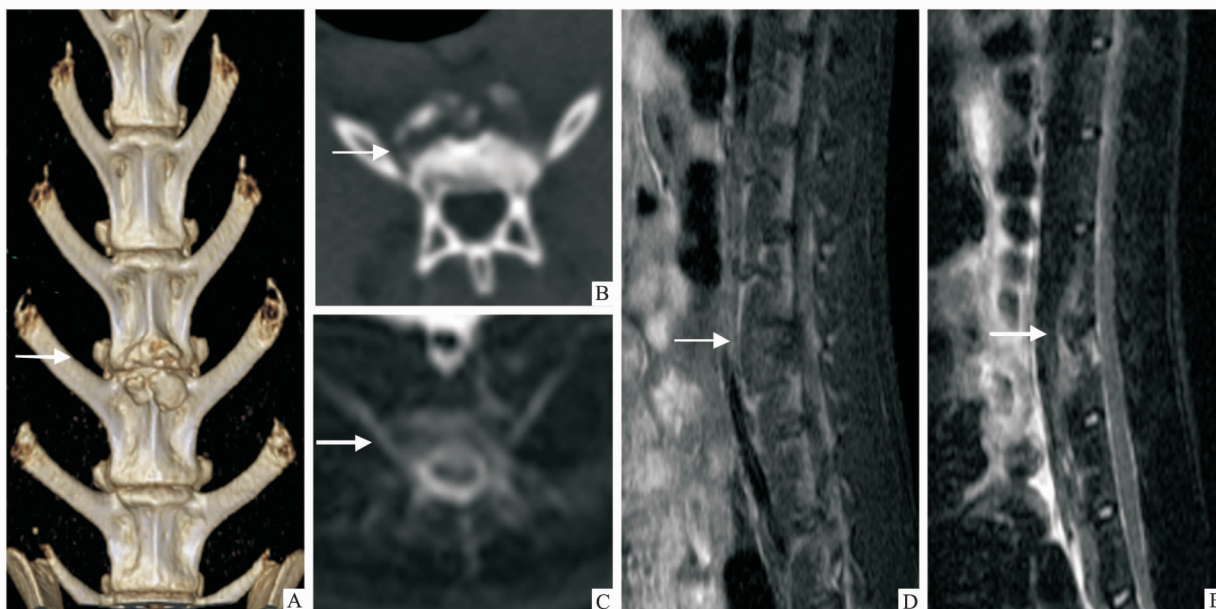


图2 新西兰兔脊柱结核模型

A:CT重建示椎间隙变窄 相邻椎体破坏 椎体边缘性、虫蚀样破坏;B:CT示椎体骨质破坏;C:腰大肌肿胀并可见椎旁脓肿;D~E:矢状位长T1WI低信号及混杂T2WI高信号改变

56 d) ,造模组中共有 21 只实验兔最终完成实验 ,对照组为 18 只。造模组中 16 只实验兔均符合至少一项造模阳性判定标准 ,视为造模阳性 ,阳性率为 76.19% (16/21) ,如:影像学出现不同程度的骨质破坏或椎体炎性水肿征象 (图 2) ;病理学可见椎体骨质破坏和 (或) 椎旁脓肿形成 ,病灶组织 HE 染色病变区可见散在的单核巨噬细胞 ,骨小梁间可见结核性肉芽肿及分散排列的巨噬细胞 ;应用 BacT/ALERT 3D 快速培养系统对病灶组织匀浆及脓液进行结核杆菌培养 ,结果为阳性 (9/21) 。造模组另 5 只实验兔及对照组实验兔影像学、病理学及微生物学均未发现任何一项阳性判定标准 ,视为造模阴性。

### 2.3 样本中 ESR 及 CRP 的测定结果

**2.3.1 ESR 的测定结果** 分别绘制造模组 (造模阳性兔/阴性兔) 及对照组 (全为造模阴性兔) 中 ESR 值的趋势图 (图 3) 。造模组阳性兔术后第 1 天迅速升高 ,第 7 天达高峰 (16.87 ± 3.97) mm/h ,此后缓慢下降并趋于稳定 ,至 56 d 降至最低 (9.81 ± 2.61) mm/h ,术前与术后 56 d 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ;造模组阴性兔造模后第 1 天逐渐升高 ,第 7 天达高峰 (6.80 ± 2.38) mm/h ,此后逐渐下降 ,至 42 d 降至术前水平 (2.00 ± 1.73) mm/h ,术前与术后 42、56 d 相比差异均无统计学意义 ;造模组阳性兔在 7、56 d 的 ESR 值均高于造模组阴性兔相

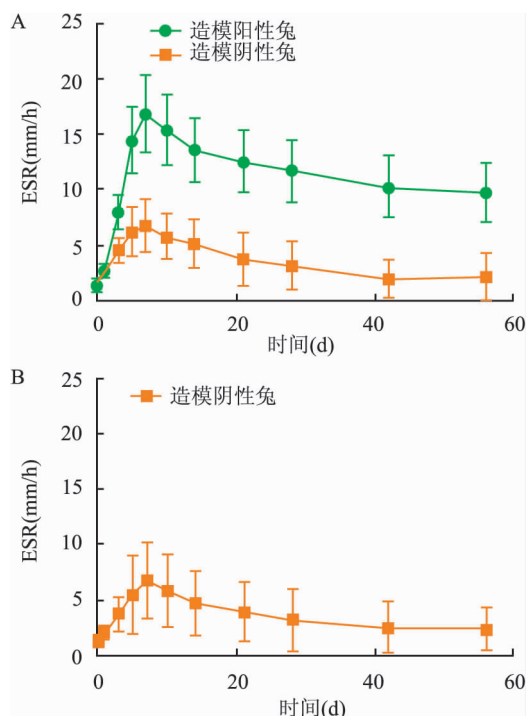


图3 造模组及对照组 ESR 值的变化趋势图  
A:造模组;B:对照组

应检测时间点的检测值 ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ;对照组第 1 天逐渐升高 ,第 7 天达高峰 (6.77 ± 3.43) mm/h ,此后逐渐下降 ,至 42 d 降至术前水平 (2.55 ± 2.35) mm/h ,术前与术后 42、56 d 相比差

异均无统计学意义;对造模组阳性兔与对照组在 7、56 d 的 ESR 值分别进行比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),对造模组阴性兔与对照组在 7、56 d 的 ESR 值分别进行比较,差异均无统计学意义。

**2.3.2 CRP 的测定结果** 分别绘制造模组(造模阳性兔/阴性兔)及对照组(全为造模阴性兔)中 CRP 值的趋势图(图 4)。造模组阳性兔术后第 1 天迅速升高,第 5 天达高峰( $12\ 984.25 \pm 1\ 063.35$ )  $\mu\text{g/L}$ ,此后缓慢下降,至 56 d 降至最低( $7\ 501.00 \pm 2\ 144.50$ )  $\mu\text{g/L}$ ,术前与术后 56 d 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );造模组阴性兔造模后第 1 天逐渐升高,第 3 天达高峰( $9\ 644.60 \pm 458.19$ )  $\mu\text{g/L}$ ,此后迅速下降,至 21 d 降至术前水平( $1\ 200.40 \pm 1\ 190.49$ )  $\mu\text{g/L}$ ,术前与术后 21、28、42、56 d 相比差异均无统计学意义;造模组阳性兔在 5、56 d 的 CRP 值均高于阴性兔相应检测时间点的检测值,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );对照组第 1 天逐渐升高,第 3 天达高峰( $9\ 936.50 \pm 653.70$ )  $\mu\text{g/L}$ ,此后迅速下降,至 28 d 降至术前水平( $841.22 \pm 828.90$ )  $\mu\text{g/L}$ ,术前分别与术后 28、42、56 d 相比差异均无统计学意义;对造模组阳性兔与对照组在 5、56 d 的 CRP 值分别进行比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),对造模组阴性兔与对照组在 5 d 与 56 d 的 CRP 值分别进行比较,差异均无统计学意义。

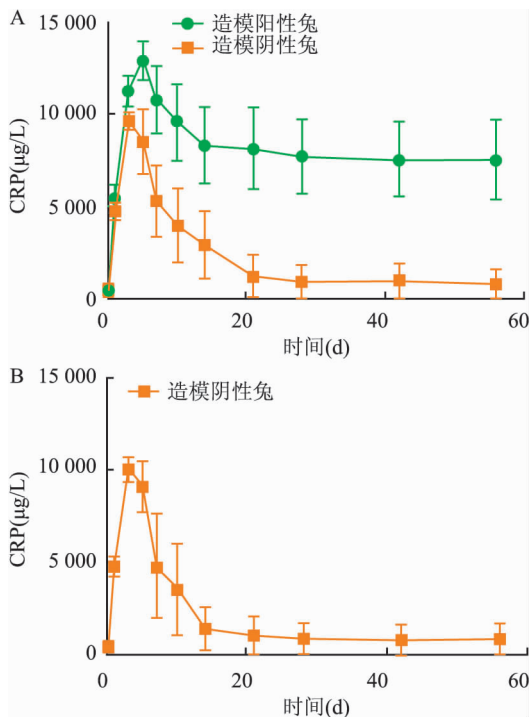


图 4 造模组及对照组 CRP 值的变化趋势图  
A: 造模组; B: 对照组

**2.3.3 ESR、CRP 与造模结核感染相关性分析** 术后 56 d 时 ESR、CRP 与造模结核感染相关性的 ROC 曲线分析(图 5),曲线下面积:ESR 为 0.953 (95% CI:0.863 ~ 1.000)、CRP 为 0.927 (95% CI:0.823 ~ 1.000),均显著  $> 0.5$ 。根据统计结果,以 Youden 指数(灵敏度 + 特异度 - 1)最大的切点为最佳筛选点(正确诊断指数)。计算得 ESR,判断新西兰兔脊柱结核造模成功的最佳筛选点为 7.5 mm/h,计算得 CRP,判断新西兰兔脊柱结核造模成功的最佳筛选点为 5 527.50  $\mu\text{g/L}$ 。分别取 ESR 及 CRP 的正确诊断指数,由图 4 可计算得出此时 ESR 及 CRP 的敏感度均为 93.8%。

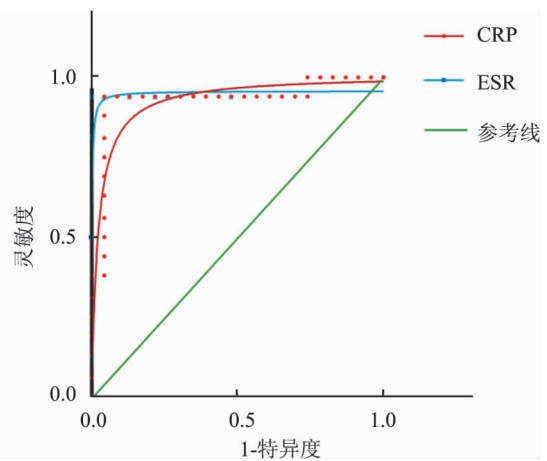


图 5 ESR、CRP 与结核造模感染相关性的 ROC 曲线分析

### 3 讨论

新西兰兔脊柱结核模型已被学者们大量应用于脊柱结核的基础研究<sup>[5-7]</sup>。随着脊柱结核发病率的逐年递增及对其研究的逐渐深入,迫切需要制定出评价结核杆菌在模型体内局部感染增殖、好转及进展的有效指标。本研究选用 H37Rv 标准菌株混悬液接种入兔腰 4-5 椎间隙,建立兔脊柱结核模型,并动态观察 ESR 及 CRP 在模型体内的变化规律,显示 ESR 及 CRP 可较快捷、敏感、可靠地反映体内结核杆菌感染情况,是评价造模情况及模型体内新药新材料疗效的可靠指标。

**3.1 兔脊柱结核模型的筛选与评价的研究现状及存在的问题** 目前,国内外对新西兰兔结核菌感染造模是否成功的判断标准是基于影像学、病理学及微生物学的综合评定,但尚有一定的假阴性率、假阳性率及不同程度缺陷。X 线片可对脊柱结核病变部位行整体观察判断,但 X 光片对早期脊柱结核诊断

的敏感性较低,且不易检出微小隐匿的结核骨质破坏区;CT检查能清晰显示病灶中的死骨以及钙化灶,但对椎体炎性水肿、轻软组织肿胀仍不易准确显示;MRI在早期炎性水肿期就能有异常表现,因此较为敏感,但检查费用较贵,需要辅助麻醉增加实验动物风险且难以量化因而影响了应用。病理学观察可对结核感染做出初步诊断,并能观察出病灶的分布范围、病变变化及发展过程,但需麻醉下解剖观察并切取标本镜检,因而干扰了后期模型的使用。结核病灶脓液或组织匀浆抗酸染色涂片检测方法虽然简便易行,但受到抗酸杆菌数量限制,靠此方法的结核杆菌阳性检出率较低,准确性、灵敏度较差。结核病灶脓液及组织匀浆培养出结核菌落是建模成功的最可靠指标,但受选用活菌群的限制,且其培养周期较长,不能及时地在早期检测出结核菌是否累积靶器官。应用PCR技术进行多方面结核分枝杆菌基因水平的检测,被认为具有较高的灵敏性及特异性,是结核病的重要诊断依据,但操作复杂,费用昂贵,可行性差。本研究表明ESR、CRP水平的检测简便易行,在造模术后56d时待手术刺激等各干扰因素趋于稳定后,可作为评价造模是否成功的可靠指标。

**3.2 新西兰兔脊柱结核动物模型中ESR及CRP的变化规律** 本研究表明,选用H37Rv标准菌株混悬液接种入兔的腰4~5椎间隙,可建立成功的兔脊柱结核模型。经影像学、病理学及微生物学对造模情况观察,造模组中造模阳性率为76.19%。本研究中,造模阳性兔体内的ESR、CRP变化规律与造模阴性兔明显不同,而造模阴性兔体内的ESR、CRP变化规律与对照组相似。ESR反映血浆中纤维蛋白原和免疫球蛋白的水平,其含量越高ESR也就越快,故感染时ESR会明显增加。本研究中造模阳性兔由于结核杆菌在病灶增殖,并伴脓肿、干酪样坏死物质、结核性肉芽肿等炎性物质形成,造模术后ESR迅速升高,至术后56d处死动物时仍维持在较高水平。而造模组阴性兔及对照组因无结核等感染因素的影响,术后ESR升高缓慢且峰值较低,术后42d已降至术前水平。造模阴性兔及对照组ESR出现幅度较小的波动,考虑与手术、失血等多种因素影响。CRP是由肝细胞合成的非特异性急性时相蛋白,能够结合并识别细菌的细胞膜,增强炎性细胞活性,但因其半衰期较短,变化显著,故一旦感染或手术源性损伤后CRP迅速升高,而当感染得到控制或创伤因素消失后血清CRP又会迅速下降。本研究中造模阳性兔术后CRP迅速升高,至第5天达到高

峰,随着创伤的修复而下降,但由于结核炎性物质的持续刺激,至术后56d处死动物时CRP仍维持在较高水平。造模阴性兔及对照组因手术创伤的影响及无结核等感染因素的影响,术后第3天达高峰后逐渐下降,至术后28d已降至术前水平。对术后56d时ESR、CRP与术后感染相关性的ROC曲线分析,曲线下面积ESR为0.954、CRP为0.929,显著 $>0.5$ 表明ESR及CRP与结核感染呈现正相关性,可反映体内结核感染情况。

**3.3 兔脊柱动物模型中ESR、CRP的应用价值及注意事项** ESR和CRP是临床上反映炎症和组织损伤的重要的非特异性标志物,具有快速、经济、简单及可靠的优点,是临床感染监测的重要指标。ESR及CRP已被应用于关节置换术后预测感染、翻修时机选择、抗感染材料研制等基础研究<sup>[8]</sup>。研究兔ESR及CRP在脊柱结核模型中的变化规律,具有重要的应用价值:①兔脊柱结核模型的筛选与评价。本研究结果表明,随着结核杆菌在动物体内增殖并发病,炎性物质的产生,故ESR及CRP明显高于正常,术后56d时随着手术源性组织损伤的修复以及术中失血等干扰因素的稳定,ESR、CRP明显升高可提示结核感染模型成功。根据统计结果,以Youden指数最大的切点为最佳筛选点,计算得ESR判断新西兰兔脊柱结核造模成功的最佳筛选点为7.5 mm/h,CRP为5 527.50  $\mu\text{g/L}$ 。此时,两者的敏感度均为93.8%。②新药、新材料以及新术式在模型体内的疗效评价标准。本研究结果表明,ESR及CRP与感染呈正相关性,其水平的变化与感染的变化基本一致,可以用来监测结核感染的活动情况和严重程度,对观察治疗效果有很好的导向作用。

ESR、CRP的应用需注意:①CRP和ESR联合动态观察可显著提高术后造模感染的确诊率以及疗效评估的可靠性<sup>[9]</sup>;②由于CRP及ESR仅能反应模型体内炎症情况,对结核感染明确诊断缺乏特异性,仍需借助影像学检查评估模型体内骨质破坏情况并排除活动性肺结核及其他内脏结核的实验兔;③病理学、抗酸染色涂片检测、微生物学等手段各有优点,ESR及CRP仍不能完全替代;④通过ESR、CRP判定结核感染模型是否成功需在造模术后56d之后进行,以排除手术刺激等因素的干扰。

综上所述,ESR及CRP能可靠地反映模型兔体内结核菌感染情况及病情进展,具有重要的应用价值。实验动物的样本量不足以及未涉及白细胞计数、降钙素原等其他炎性指标是本研究的不足之处。

我们将在后续的实验增加样本量,对相关参数进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] 刘晓晨. 多种影像学联合组织病理学检查对脊柱结核早期的评价 [D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2014.
- [2] Geng G, Wang Q, Shi J, et al. Establishment of a new Zealand rabbit model of spinal tuberculosis [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2015, 28(3): E140-5.
- [3] 耿广起, 王 骞, 王自立, 等. 构建新西兰兔脊柱结核模型的对比研究 [J]. *中华骨科杂志*, 2014, 34(2): 216-23.
- [4] Liu X, Jia W, Wang H, et al. Establishment of a rabbit model of spinal tuberculosis using *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2015, 68(2): 89-97.
- [5] 丛晓明. 载三联抗痨药 HRZ 硫酸钙/聚氨基酸复合人工材料在兔脊柱结核模型体内缓释性能的实验研究 [D]. 银川:宁夏医科大学, 2014.
- [6] 谢学虎. 载抗痨药 HRZ 硫酸钙/聚氨基酸人工骨兔脊柱结核植骨融合的影像学评价 [D]. 银川:宁夏医科大学, 2013.
- [7] 张 卓. 载三联抗痨药硫酸钙/聚氨基酸人工骨植骨愈合的病理学及超微结构观察 [D]. 银川:宁夏医科大学, 2013.
- [8] 周 强, 李 颖, 吴继明, 等. 万古霉素-脂质体对兔股骨头置换感染模型预防作用的实验研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(23): 4433-7.
- [9] Gravius S, Gebhard M, Ackermann D, et al. Analysis of 18F-FDG uptake pattern in PET for diagnosis of aseptic loosening versus prosthesis infection after total knee arthroplasty. A prospective pilot study [J]. *Nuklearmedizin*, 2010, 49(3): 115-23.

## Study on the change of ESR and CRP in the building of rabbit spinal tuberculosis model

Yue Xuefeng<sup>1</sup>, Wang Peng<sup>1</sup>, Shi Jiandang<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Graduate School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004;

<sup>2</sup>Dept of Orthopedic Spine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

**Abstract Objective** To observe the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C reactive protein (CRP) changes in the New Zealand rabbit model of spinal tuberculosis. **Methods** New Zealand rabbits were randomly divided into two groups: 25 in the model group and 20 in the control group. The module was drilled in the lumbar 4 and 5 intervertebral spaces, filling in the gelatin sponge, in which the infusion of H37Rv tuberculosis standard strain suspension was 0.1 ml; the control group was injected with saline 0.1 ml. The general condition of rabbits were observed, and by imaging, pathology, microbiology to evaluate model conditions; to observe the changes of ESR and CRP at different time points before and after operation (1, 3, 5, 7, 10, 14, 28, 42, 56 d). The correlation between ESR and CRP and spinal tuberculosis infection in rabbits was investigated. **Results** 56 days after the operation, 21 rabbits of model group were finished, and in the control group was 18. By imaging, pathology, microbiology: in the model group, spinal tuberculosis infection positive rate was 16/21 (76.19%), with at least one model positive criterion; In model group, the other 5 rabbits in control group and negative rabbits were not found. The changes of ESR and CRP of positive rabbits in model group were significantly different from those of negative rabbits in model group, while the changes of ESR and CRP of negative rabbits in model groups were similar to those in control group. The changes of ESR and CRP of positive rabbits in model group were significantly different from those of negative rabbits in model group, while the changes of ESR and CRP of negative rabbits in model groups were similar to those in control group. The ESR and CRP increased rapidly after operation, and the peak value of ESR was  $(16.87 \pm 3.97)$  mm/h on the 7th day after operation. CRP peaked at the 5th day after operation  $(12984.25 \pm 1063.35)$  g/L, and the values of ESR and CRP were stable at 42 days after surgery, ESR and CRP remained at a high level on the 56th day after operation. The ESR of the rabbits in the model group and the control group reached the peak on the 7th day after operation, then decreased gradually, and decreased to the preoperative level at 42 days after operation. CRP reached its peak on the third day after operation, then decreased gradually, and decreased to the preoperative level on the 28th day after operation. The measured values of ESR and CRP at the peak of the model group and the peak at the end of the experiment (56 days) were higher than those of the model group and the control group at the same time point, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.013.html>

## TMEM88 真核表达质粒的构建及其功能研究

倪升丽<sup>1</sup> 胡富勇<sup>1</sup> 李增<sup>2</sup> 孟晓明<sup>2</sup> 王学富<sup>2</sup> 徐涛<sup>2</sup>

**摘要** 目的 构建 TMEM88 的真核表达质粒,并研究其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 提取人肝星状细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA 作为模板,利用 PCR 法扩增出 TMEM88 的 CDS 序列,双酶切后连接到 pEGFP-C2 载体上,然后进行转化、质粒抽提、酶切鉴定,最后挑取阳性克隆送生物公司测序。将 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒分别转染至人肝癌细胞株 SMMC-7721 中,通过 MTT 实验和流式细胞术检测其对细胞增殖和凋亡的影响。结果 测序结果显示 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒构建成功;MTT 实验结果显示,过表达组细胞的增殖率为  $(0.625 \pm 0.07)$ ,显著低于正常组的  $(0.880 \pm 0.09)$  ( $P < 0.05$ );流式细胞术结果显示,过表达组细胞的凋亡率为 22.1%,显著高于正常组的 9.1%。结论 TMEM88 能够显著抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖,并促进其凋亡,为进一步了解 TMEM88 的功能、寻求肝癌治疗的新方向奠定了基础。

**关键词** TMEM88;转染;增殖;凋亡

中图分类号 R 349.65

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0839-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.013

肝癌是一种常见的消化系统肿瘤,具有恶性程度高、发病率和死亡率高等特点,流行病学调查数据<sup>[1-4]</sup>显示,肝癌位居肿瘤发病率的第 5 位,死亡率

更是高达第 3 位,仅次于胃癌和肺癌,因此寻找肝癌行之有效的治疗方法至关重要。近年来,基因工程技术快速发展,为医学研究和疾病治疗开辟了崭新的道路<sup>[5]</sup>。TMEM88 定位在 17 号染色体的 p13.1,其 CDS 序列长度为 477 bp,编码由 159 个氨基酸残基组成,分子量约为 17 ku 的蛋白,TMEM88 是一种跨膜两次的蛋白,两个跨膜结构域分别由 43-63、88-108 位氨基酸残基组成,其在人类组织中广泛表达,且在其 C 端存在着 V-W-V 序列,能够结合 DVL 蛋白的 PDZ 结构域,从而破坏 DVL 和 LRP5/6、Frizzles 等的结合,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典通路,进而发挥其生物功能<sup>[6-9]</sup>。目前,对于人恶性肿瘤细胞中 TMEM88 的表达、亚细胞定位以及潜在分子机制的研究还比较有限<sup>[10]</sup>。该研究将通过构建 TMEM88 的真核表达载体,研究其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人肝星状细胞 LX-2、肝癌细胞 SMMC-7721、pEGFP-C2 载体、TG1 大肠杆菌感受态均由本实验室保存。TRIzol 裂解液(美国 Sigma 公司);PrimeSTAR Max 酶、DL 2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司);EcoR I、Kpn I 内切酶、T4 连接酶、逆转录试剂盒(加拿大 Ferments 公司);胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒(美国 Axygen 公司);细胞凋亡试剂盒(上海 BestBio 公司);Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(美国 Invitrogen 公司);DMEM 培养基、Opti-MEM、胎牛血清(美国 Gibco 公司);引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

### 1.2 方法

2017-02-05 接收

基金项目:合肥市科技攻关计划项目(编号:合科[2015]163号-38);  
安徽医科大学博士科研资助基金(编号:XJ201536);安徽  
高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2016A348)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)肿瘤放疗科,合肥 230011

<sup>2</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:倪升丽,女,主管护师;

徐涛,男,讲师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

The ROC curve of ESR, CRP and tuberculosis modeling infection was analyzed at 56 days after operation. The area under the curve of ESR was 0.953, CRP was 0.927, significantly higher than 0.5, calculate the maximum cut point for the Youden index for the best screening point. The best screening point for ESR was 7.5 mm/h; the best screening point for CRP was 5 527.50  $\mu$ g/L. **Conclusion** ESR and CRP can reflect the infection and the progression of tuberculosis in rabbits. The 56th day after modeling can be used as a reliable index for screening rabbits with spinal tuberculosis.

**Key words** spinal tuberculosis; animal model; rabbits; erythrocyte sedimentation rate; C reactive protein