

- [9] TOKUMURA A, MIYAKE M, NISHIOKA Y, et al. Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilization patients [J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 195-199.
- [10] 郭燕红, 张雷, 邵素霞. 雌、孕激素对 LPAR3 在小鼠子宫内膜围着床期的表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(2): 178-182.
- [11] YE X, HAMA K, CONTOS J J, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing[J]. Nature, 2005, 435(738): 104-108.
- [12] LESSEY B A, PALOMINO W A, APPARAO K B, et al. Estrogen receptor- α (ER- α) and defects in uterine receptivity in women[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4 (Suppl 1): S9-S18.
- [13] CHEN C, YAN Q, LIU K, et al. Endometrial receptivity markers in mice stimulated with raloxifene versus clomiphene citrate and natural cycles[J]. Reprod Sci, 2016, 23 (6): 748-755.

(收稿日期: 2018-12-15 修回日期: 2019-03-12)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.12.029

氧化石墨烯检测手足口病原体的可行性探讨*

王晓琴

(山西医科大学汾阳学院, 山西汾阳 032200)

摘要:目的 通过氧化石墨烯(GO)检测体系和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法对手足口病两种常见病毒 CA16 和 EV71 进行检测, 探讨 GO 检测体系对病毒的快速检测在临床运用中的可行性。方法 采集确诊为手足口病患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液标本共 228 例, 运用 GO 检测体系和 RT-PCR 法对标本中的 CA16 和 EV71 进行检测。结果 RT-PCR 检测结果显示, 3 种标本病原体阳性检出率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=4.56, P>0.05$)。GO 检测结果显示, 3 种标本病原体阳性检出率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=3.08, P>0.05$)。对于两种检测方法检测结果不同的标本, 经基因测序后, 排除了假阳性和假阴性, 证明了 GO 检测体系的可行性。结论 GO 检测法具有高灵敏度和 DNA 特异性结合的特点, 有望成为实现简便、快速、准确、经济的病毒检测法且可以运用到临床中对 CA16 和 EV71 两种病毒进行检测。

关键词: 氧化石墨烯; 逆转录-聚合酶链反应; 手足口病**中图分类号:** R446.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2019)12-1726-04

手足口病(HFMD)是由 CA16 和 EV71 为主要病原体引起的传染性极强的全球性疾病, 两种病原体引起的 HFMD 临床症状表现相似, 但 EV71 引起的 HFMD 临床表现更重, EV71 容易引起如脑炎、脑膜炎等中枢神经系统的严重并发症, 严重者甚至可危及生命^[1]。HFMD 属于自限性疾病, 80% 的 HFMD 患儿无明显的症状或体征, 但可作为传染源传播^[2]。2008 年 5 月, 原卫生部发布通知, 将 HFMD 列为丙类传染病^[3], 据 ZHOU 等^[4]的报道, HFMD 发病率在传染病中位列第二, 该病已成为导致患儿死亡的第 6 大原因, 因此找到一种早期、快速、准确诊断 HFMD 的方法显得尤为重要。本文采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法和氧化石墨烯(GO)检测体系对 CA16 和 EV71 两种病毒进行快速检测, 比较两种方法之间的优缺点, 为 HFMD 的综合防治提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集确诊为 HFMD 患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液标本共 228 例, 其中粪便拭子 156 例, 咽拭子 54 例, 疱疹液 18 例。运用 GO 检测体系和 RT-PCR 法对标本中 CA16 和 EV71 两种病毒进行检

测。所有标本的检测都经过患儿家长的同意并签订同意书。

1.2 仪器与试剂 采用美国应用生物系统公司 7500 定量 PCR 仪; 上海博讯实业有限公司 YXQ-30S2 型立式压力蒸汽灭菌锅; 宁波新芝生物科技有限公司 JY92-IIN 超声波细胞粉碎机; 上海光谱仪器有限公司 SP752 紫外分光光度计; 美国 Covaris 生化公司 DNA 剪切仪; 日本日立集团 F-2700 荧光分光光度计; 北京六一生物科技有限公司 DYCP-31DN 电泳仪; DH-360 电热恒温水浴箱。病毒总 RNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 电泳缓冲液 TBE(北京索莱宝科技有限公司); DNA 标志物(大连宝生物科技有限公司); GO(山西大学郭玉晶教授制备且惠赠); 阳性标本(山西省汾阳医院提供)。

1.3 方法 鉴于 HFMD 的传播途径包括消化道、呼吸道及密切接触传播, 课题组分别采集了患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液作阳性结果比较分析。

1.3.1 粪便拭子标本的采集 使用专用采样棉签, 直接采集患儿粪便标本约 8 g, 将棉签放入装有 3~5 mL 病毒保存液的无菌采样管中, 于 4℃ 暂存, 12 h 内

* 基金项目: 山西省重点研发计划研发项目(201603D321094)。

送达实验室。分别将 CA16 感染和 EV71 感染的粪便拭子置于磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH = 7.4, 由 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 NaCl 、 KCl 组成) 中浸泡、震荡后, 2 500 r/min 离心 20 min, 静置 3~5 min 后, 尽量吸净上清液, 取沉淀约 200 μL , 用于提取病毒核酸。标本处理和核酸提取必须在生物安全 II 级或以上的实验室的生物安全柜中进行。处理后的标本必须置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存, 需长期保存的标本必须存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.3.2 咽拭子标本的采集 采集患儿患病 7 d 内的咽拭子标本, 用于病原检测。采用专用采样棉签, 适度用力拭抹咽后壁扁桃体部位, 应避免触及舌部; 迅速将棉签放入装有 3~5 mL 病毒保存液的采样管中, 在靠近顶端处折断棉签杆, 旋紧管盖并密封, 以防干燥。采集的标本于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 暂存或立即送达实验室, 充分混匀标本, 室温静置 10 min, 取上清液 200 μL 用于核酸的提取, 需短时期保存的标本于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 长期保存的标本放置于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.3.3 疱疹液标本的采集 同时采集多个疱疹作为 1 份标本。用 75% 乙醇对疱疹周围的皮肤消毒, 然后用消毒针将疱疹挑破, 用棉签蘸取疱疹液, 迅速将棉签放入装有 3~5 mL 病毒保存液的采样管中, 在靠近顶端处折断棉签杆, 旋紧管盖并密封。保存方法及提取方法同咽拭子标本一致。

1.3.4 GO 检测体系的构建 荧光分光光度计是用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱的一种仪器。被测的荧光物质在激发光照射下所发出的荧光经过单色器处理后将各波长的荧光强度讯号输出至计算机上, 计算机进行读数并寻峰, 得出荧光光谱图。GO 是一种新型的二维纳米材料, 具有荧光淬灭性能, 对单链核酸吸附, 对双链核酸脱附; 荧光素吸附在 GO 的表面后不再发光, 而 CA16 或 EV71 与探针结合后, 离开 GO, 荧光信号增强。通过检测反应前后荧光信号的差别, 达到对目标核酸病毒检测的目的。GO 检测体系的性能在相关研究中已经得到了认可^[5-6]。

1.3.5 构建 DNA 探针 (FDNA)-BDNA-GO 系统 根据 DNA 的特异性, 基于 VP1 区域的序列差异, 搜索所有的 GenBank 中的可用序列, 设计 FDNA 的序列, 然后加入一段与 FDNA 互补配对的寡核苷酸 BDNA。在 $1\times\text{SPSC}$ 缓冲液中加入 50 nmol/L 的 CA16-FDNA, 50 nmol/L 的 EV71-FDNA 和 50 nmol/L 的 BDNA, 于室温下放置 1 h, FDNA 与 BDNA 根据碱基互补配对自动形成双链复合物, 然后加入浓度为 6 g/mL 的 GO, 室温下放置 0.5 h, 形成了稳定的 FDNA-BDNA-GO 系统。

1.3.6 总 RNA 的提取 临床标本经过处理后, 用天根生化科技有限公司的病毒 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取, 具体操作步骤按说明书 (3 种临床标本, 需操作 3 次), 最终洗脱收集 RNA 提取液体积约为

70 μL 。取 10 μL 总 RNA 作为逆转录模板, 使用 cDNA 第一链合成试剂盒按操作步骤进行逆转录, 随机引物为逆转录引物合成 cDNA 第一链。在 PCR 仪上进行逆转录反应, 条件: $30\text{ }^\circ\text{C}$ 预热 5 min, $42\text{ }^\circ\text{C}$ 预热 15 min, 去除基因组及逆转录反应, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 酶变性失活 3 min。反应结束后置冰上冷却。用 DNA 纯化试剂盒对 cDNA 进行纯化, 然后随机剪切成 50 bp 大小的片段。随后加入到 1 mL 的 CA16-FDNA-BDNA-GO 和 EV71-FDNA-BDNA-GO 系统中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 电热恒温水浴箱保温 30 min, 用荧光分光光度计检测 FDNA-BDNA-GO 系统在 500 nm 激发光源下 CA16-cDNA 的荧光强度和 560 nm 激发光源下 EV71-cDNA 的荧光强度。同时取健康拭子标本作为阴性对照。采用 RT-PCR 方法检测 CA16 病毒、EV71 病毒。病毒总 RNA 的提取及逆转录反应同上。

1.3.7 PCR 的扩增 将逆转录完成后的待测用标本混浊液 3 000 r/min 离心 30 s 混匀标本放入 PCR 扩增仪, 扩增条件: $40\text{ }^\circ\text{C}$ 25 min, 1 个循环; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 1 个循环; $93\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 45 s, 40 个循环。

1.3.8 电泳分析 配胶: 在锥形瓶中加入 2 g 琼脂糖粉末, 加入适量电泳缓冲液混匀; 微波炉加热至沸腾, 融化琼脂糖, 冷却到约 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 加入溴化乙锭 (EB) 至终浓度为 5 g/L, 将胶倒入模具中, 插上梳子, 待胶凝固移至电泳槽中, 倒入电泳缓冲液至淹没电泳孔。上样: 包括标志物在内的 DNA 标本中分别加入适量电泳上样液, 并移至电泳孔中。电泳: 开始电泳, 时间为 45 min 至 1 h。

1.3.9 观察结果 在紫外透射仪上观察 PCR 扩增物的结果, 并采集图片做记录。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 对数据进行分析。计数资料采用百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 CA16 与 EV71 在 3 种标本中的阳性情况 RT-PCR 检测结果显示, 在 156 例粪便拭子标本中, EV71 阳性 103 例, CA16 阳性 37 例, 两种病原体均阳性有 20 例, 总阳性率为 89.7% (140/156); 在 54 例咽拭子标本中, EV71 阳性 18 例, CA16 阳性 5 例, 两种病原体均阳性有 1 例, 总阳性率为 42.5% (23/54); 在 18 例疱疹液标本中 EV71 阳性 12 例, CA16 阳性 6 例, 总阳性率为 100.0% (18/18)。3 种标本病原体阳性检出率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=4.56, P>0.05$)。

2.2 GO 检测 CA16 与 EV71 在 3 种标本中的阳性情况 GO 检测结果显示, 在 156 例粪便拭子标本中, EV71 阳性 106 例, CA16 阳性 35 例, 两种病原体均阳性有 21 例, 总阳性率为 90.4%; 在 54 例咽拭子标本中, EV71 阳性 18 例, CA16 阳性 6 例, 两种病原体均阳性有 3 例, 总阳性率为 44.4%; 疱疹液中 EV71 阳

性 12 例,CA16 阳性 6 例,总阳性率为 100.0%。3 种标本病原体阳性检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.08,P>0.05$)。

2.3 两种方法检测粪便拭子病原体阳性率的比较
两种方法检测粪便拭子中 EV71 的检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.35,P>0.05$)。见表 1。两种方法检测粪便拭子中 CA16 的检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.71,P>0.05$)。见表 2。两种检测结果相异的标本,送至上海生工生物科技股份有限公司进行了基因测序,排除了假阳性和假阴性,证实了 GO 检测法的可行性。

GO	RT-PCR		合计
	阳性数	阴性数	
阳性数	108	4	112
阴性数	1	43	44
合计	109	47	156

GO	RT-PCR		合计
	阳性数	阴性数	
阳性数	56	2	58
阴性数	1	97	98
合计	57	99	156

3 讨 论

HFMD 严重影响儿童的身心健康,但目前既无有效的疫苗,又无特效药物治疗该病。因此需要通过标本的检测来对症治疗,检测阳性率的高低取决于标本的质量和类型。本研究采用两种方法对 156 例粪便拭子检测,其阳性率均大于 90%;18 例疱疹液标本进行了检测,阳性率为 100.0%;对 54 例咽拭子标本进行了检测,其阳性率小于 50%;但 3 种标本病原体的阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。同胡海赞等^[7]、闫红静等^[8]的报道相似。粪便最容易采集,家长及患儿容易接受且无创伤,因此建议使用粪便拭子作为检测 HFMD 的临床标本,且相关文献也表明粪便是最理想的检测肠病毒的标本^[9]。

目前诊断该病的实验室检查方法有病毒分离培养、血清学检测和核酸检测^[10]。病毒学检测被认为是诊断 HFMD 和明确病原体的“金标准”,然而其灵敏度较低,有国外相关报道显示,病毒培养的阳性率通常低于 60%^[11]。且病毒培养通常需要 4~15 d,某些 EV 血清型在普通细胞培养中不进行复制,如 EV71、CA16^[1]。随着分子生物学的发展,RT-PCR 被广泛用于病毒检测,它具有高特异度和高灵敏度的特点,但因缺乏标准化且无法检测两种或更多的病毒种类,受到一定限制^[1]。由于操作步骤烦琐,该方法在操作

过程中容易污染标本而出现假阳性或假阴性结果^[12];在 PCR 扩增后,需要电泳,EB 对环境和人体危害性强^[13],易引起人体皮肤病,现多用 Goldview 代替,但染色效果不如 EB 明显。

自从 2004 年英国物理学家成功从石墨中分离出石墨烯后,由于石墨烯的优良性能,已经被广泛地应用在医学领域^[14]。GO 由于其将荧光淬灭的高灵敏度和 DNA 特异性结合的特点,有望成为实现简便、快速、准确、经济的病毒检测法。GO 法检测 CA16 和 EV71 病毒与 RT-PCR 法相比具有以下优点:(1)操作简单,步骤少,减少了污染,缩短时间。RT-PCR 操作一般需要 4~6 h,而 GO 检测 CA16 病毒和 EV71 病毒只需 2 h,实现了在偏远地区及基层医疗单位早期诊断。(2)不需要昂贵的 PCR 设备,虽然在 GO 检测法中也用到了 PCR 仪,但只起到温控的作用,完全可以由恒温水浴箱代替。(3)GO 检测结果为一个数值,比较直观;RT-PCR 结果是不同长度的 DNA 片段,是一个信号值,需要专业的技术人员操作鉴定。(4)GO 检测法是一种高通量的筛选试验,能够在疫情大范围暴发期间进行快速诊断^[15]。病毒核酸是 HFMD 感染后出现最早的检测指标,GO 检测法有望成为检测 HFMD 快速、准确、经济的方法。

参考文献

[1] CHEN S P, HUANG YC, LI W C, et al. Comparison of clinical features between coxsackievirus A2 and enterovirus 71 during the enterovirus outbreak in Taiwan, 2008: a children's hospital experience[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2010, 43(2): 99-104.

[2] 杜阳光, 杨晋川, 晏嘉璐, 等. 血清中 EV71 型抗体检测对手足口病诊断的意义[J]. 中华全科医学, 2011, 9(10): 1574-1575.

[3] ZHANG X, WANG H, DING S, et al. Prevalence of enteroviruses in children with and without hand, foot, and mouth disease in China[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(7): 606-611.

[4] ZHOU H, GUO S Z, ZHOU H, et al. Clinical characteristics of hand, foot and mouth disease in Harbin and the prediction of severe cases[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(7): 1261-1265.

[5] 齐艺. 基于解旋酶促信号扩增的氧化石墨烯生物传感平台检测 microRNA 的研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2017.

[6] 杨朗. 基于杂交链式反应与氧化石墨烯高灵敏度检测 MicroRNA 的荧光传感器分析[D]. 保定: 河北大学, 2014.

[7] 胡海赞, 乔蓉, 沈琦, 等. 2009—2011 年上海市手足口病病原学检测及其临床特点分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2012, 26(5): 341-343.

[8] 闫红静, 王小光, 骆玲飞, 等. 2009—2016 年上海市闵行区手足口病病原学检测及流行病学特征分析[J]. 复旦学报

(医学版), 2017, 9(5): 602-607.

- [9] TSAO L Y, LIN C Y, YU Y Y, et al. Microchip, reverse transcription-polymerase chain reaction and culture methods to detect enterovirus infection in pediatric patients [J]. *Pediatr Int*, 2006, 48(1): 5-10.
- [10] 欧晓燕, 许彬. 手足口病实验室检测方法的进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(6): 428-432.
- [11] HUANG K Y, YANG S, TSAO K C, et al. Bedside immunochromatographic test for enterovirus 71 infection in children [J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(3): 548-552.
- [12] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 875-876.
- [13] 伏瑾, 张艳玲, 孙春荣, 等. 实时 RT-PCR 检测 159 例手足口病患儿样本中肠道病毒的结果分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2009, 12(6): 488-490.
- [14] 李一鸣, 陈冠辉, 余东升. 石墨烯及其衍生物作为基因载体的研究进展[J/CD]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2018, 4(12): 131-133.
- [15] WANG J J, JIANG Y Z, LIN Y, et al. Simultaneous Point-of-Care Detection of Enterovirus 71 and Coxsackievirus B3 [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(21): 11105-11112.

(收稿日期: 2018-12-11 修回日期: 2019-02-16)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 12. 030

肌电生物反馈治疗急性脑卒中患者上肢功能障碍的临床疗效*

景颖颖, 岳蕴华[△], 李大伟

(同济大学附属杨浦医院/上海市杨浦区中心医院神经内科, 上海 200090)

摘要:目的 探讨肌电生物反馈治疗急性脑卒中患者上肢功能障碍的临床疗效。方法 选择 2017 年 4 月至 2018 年 3 月该院收治的 85 例脑卒中患者, 按照随机数字表法分为对照组 42 例、观察组 43 例。对照组进行常规药物治疗和康复治疗, 观察组加用肌电生物反馈治疗。采用简化 Fugl-Meyer 运动功能评定量表(FMA)评价患者上肢运动功能, 采用简化巴氏指数量表(BI 评分)评价患者的日常生活能力, 比较两组患者的治疗有效率和治疗前后的上肢运动功能、日常生活能力。**结果** 观察组患者治疗有效率为 90.70%, 对照组患者治疗有效率为 76.19%, 观察组治疗有效率显著高于对照组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.807, P = 0.028$); 两组患者 FMA 评分均比治疗前有明显改善, 且观察组 FMA 评分高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 两组患者 BI 评分均较治疗前提高, 且观察组 BI 评分高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 肌电生物反馈治疗能促进急性脑卒中患者上肢运动功能恢复, 提高患者日常生活能力。

关键词: 脑卒中; 肌电生物反馈; 偏瘫; 康复治疗

中图法分类号: R743

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)12-1729-04

急性脑卒中是神经系统常见疾病, 具有发病率高、病死率高、致残率高和复发率高的特点。我国每年新发 150 万~200 万脑卒中患者, 其中约 80% 遗留不同程度神经功能障碍和肢体功能障碍, 使患者的日常生活自理能力大大下降, 给家庭及社会带来沉重负担^[1]。因此, 脑卒中急性期的治疗及早期的康复训练显得尤为重要。研究表明, 脑卒中患者大多伴有上肢神经传导功能障碍, 是全球范围内导致残疾的首要因素^[2]。人体的上肢活动多为精细活动, 相对于下肢而言, 其受大脑皮层控制面积更大, 因此, 脑卒中偏瘫患者上肢功能障碍是康复治疗的重点和难点。肌电生物反馈疗法是依据中枢神经系统可塑性、重组性理论发展起来的一种新型的康复治疗方法, 它将生物反馈技术与电刺激方法相结合, 是利用直观的视觉反馈方式将患者自身意识不到的肌肉组织生物电活动放大、

增强, 转换成可以被患者重新感知到的视、听等讯号, 并把这些讯号反馈给大脑, 以便人体能根据这些讯号自主地训练, 主动控制肌肉组织的生物电活动, 从而提高患者的主观能动性, 更好地进行主动康复训练和完成自我训练, 以达到康复治疗目的, 改善神经功能缺损症状和瘫痪侧肢体运动功能, 最终提高患者的日常生活能力, 减少脑卒中后残疾^[3]。本院神经内科在常规药物治疗和康复训练的基础上应用肌电生物反馈治疗急性脑卒中患者上肢运动功能障碍, 取得良好效果, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 4 月至 2018 年 3 月在本院神经内科治疗的 85 例脑卒中患者为研究对象, 诊断标准符合全国脑血管病学术会议通过的脑卒中诊断标准^[4-5], 并经颅脑 CT 或 MRI 检查证实。纳入

* 基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(16DZ1930104)。

[△] 通信作者, E-mail: 447879206@qq.com。