

牛病毒性腹泻病毒 RT-PCR 方法的建立及应用

王 吉,付 瑞,李晓波,王淑菁,王莎莎,李 威,秦 骁,巩 薇,
岳秉飞*,贺争鸣

(中国食品药品检定研究院,国家实验动物微生物遗传检测中心,北京 100050)

【摘要】 目的 建立用于牛源样本中牛病毒性腹泻病毒(BVDV)双重 RT-PCR 检测方法。**方法** 选择已发表的 BVDV 1 型和 BVDV 2 型包含 5' UTR 区高保守区域基因作为靶基因,分别设计合成引物,建立双重 BVDV RT-PCR 方法,并对方法的特异性、敏感性、稳定性等进行方法学评价。同时用建立的 RT-PCR 方法检测了小牛血清、小牛血清去蛋白提取液、脾多肽注射液等 41 批次牛源性样本和 64 份牛血浆样本。牛源样本和 64 份牛临床样本。**结果** 建立的 BVDV RT-PCR 检测方法 with 牛副流感病毒 III 型(BPIV3)、猪瘟病毒(CSFV)、乙型脑炎病毒(JEV)均无交叉反应;检测 BVDV 1 型和 BVDV 2 型 DNA 模板最低浓度分别为每微升 8.87×10^2 拷贝和 6.31×10^2 拷贝, BVDV 1 型和 2 型 cDNA 在 -30°C 冰箱放置 12 个月仍可检测出目的条带。应用建立的 BVDV RT-PCR 方法检测 41 批次牛源样本和 64 份牛血浆样本,核酸阳性率分别为 14.6% 和 29.7%。**结论** 建立的 BVDV RT-PCR 检测方法具有快速、特异、敏感及稳定的特点,可用于牛源样本携带 BVDV 核酸的检测。

【关键词】 牛病毒性腹泻病毒;RT-PCR;牛源样本

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 11-0068-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.014

Establishment and application of a RT-PCR detection method for bovine viral diarrhea virus

WANG Ji, FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, WANG Sha-sha, LI Wei,

QIN Xiao, GONG Wei, YUE Bing-fei*, HE Zheng-ming

(National Institutes for Food and Drug Control, National Center for Quality of Laboratory Animal, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To establish a dual RT-PCR detection method for bovine viral diarrhea virus (BVDV) in bovine-derived samples. **Methods** The primers were designed and synthesized according to the published BVDV1 and BVDV2 genes containing highly conservative sequences in the 5' untranslated regions (5' UTR) to establish the dual RT-PCR method. The specificity, sensitivity, stability of this method were evaluated. Then 41 bovine-derived samples and 64 bovine plasma samples including bovine calf serum, deproteinized calf serum extract and one lienal polypeptide injection were detected with this method. **Results** There was no cross reaction with bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3), classical swine fever virus (CSFV) and Japanese encephalitis virus (JEV) when samples were detected with the established dual RT-PCR method. The lowest concentration of template DNA for detection of BVDV1 and BVDV2 was 8.87×10^2 copies and 6.31×10^2 copies per microliter, respectively. Electrophoresis bands of about 151 bp and 303 bp were still amplified and detected after the BVDV1 and BVDV2 cDNA was stored at -30°C for 12 months. The BVDV positive

【基金项目】 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金项目(编号:2015X5)。

【作者简介】 王吉(1974 -),女,副研究员,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail: wj_nd_jds@sina.com

【通讯作者】 岳秉飞(1960 -),研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: y6784@126.com

rate of 41 bovine-derived samples and 64 bovine plasma samples detected with this dual RT-PCR method was 14.6% and 29.7%, respectively. **Conclusions** The established dual RT-PCR method has the advantages of high efficiency, specificity, sensitivity and stability, and can be used for the detection of BVDV in bovine-derived samples.

【Key words】 Bovine viral diarrhea virus; RT-PCR; Bovine-derived samples

牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 又称黏膜病病毒 (mucosal disease virus, MDV), 属黄病毒科 (flaviviridae) 瘟病毒属 (pestivirus)。病毒粒子大小为 40 ~ 60 nm, 为有囊膜单股正链 RNA 病毒^[1-2]。BVDV 可引起许多临床症状及疾病, 包括繁殖障碍、呼吸综合征、先天性缺陷、肠炎、持续感染 (PI) 和黏膜病 (MD) 等, 患牛表现发热、白细胞减少、腹泻、流产、黏膜糜烂溃疡等急性感染症状及小牛先天持续性感染等症状。除牛以外, 易感动物还包括骆驼、绵羊、山羊、猪、鹿及多种野生反刍动物。该病毒呈世界性分布, 广泛分布于美国、澳大利亚、新西兰、匈牙利、加拿大、阿根廷、日本、印度及非洲和欧洲许多养牛发达国家, 是危害养牛业的重要病原之一^[2], 给养牛业造成了严重的经济损失^[2-4]。

随着生物医学技术的不断发展, 动物源性生物制品的开发利用日益增多, 尤其是牛源性生物制品的开发利用越来越广泛。同时伴随着科技及对药品生物制品质量发展的要求, 人们对牛源性制品是否携带或潜在病毒污染, 携带或潜在病毒是否会通过直接或间接途径对人造成危害或者传染病的扩散也越来越关注。为保障人民用药安全及避免传染病的扩散, 最大限度地降低使用牛源性生物制品传播牛携带相关病毒的风险, 本实验建立了快速、特异、敏感的 BVDV 双重 RT-PCR 方法, 用于对牛及人用牛源性生物制品及原材料可能携带或潜在 BVDV 的检测, 对保证牛源材料及牛源生物制品的使用安全性、保障人民用药安全具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 病毒与样品

牛病毒性腹泻病毒 1 型 (bovine viral diarrhea virus type 1, BVDV1)、牛副流感病毒 3 型 (bovine parainfluenza virus type 3, BPIV3) (编号分别为 VR-1422、VR-281); 购自美国 ATCC 公司; 牛病毒性腹泻病毒 2 型 (bovine viral diarrhea virus type 2, BVDV2)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV): 本室冻存; 乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV): 由本院病毒一室提供; BVDV1 和 BVDV2 pGEM-T Easy-pol 质粒标准品: 委托宝生物工程 (大连) 有限公司合成; BVDV1 和 BVDV2 引物: 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 41 批次人用牛源样本 (编号: Ny1 ~ Ny41): 国内 8 省市 12 个厂家和国外 2 个厂家提供; 64 份牛肛拭子样本 (编号: g1 ~ g64): 国内某单位提供。

1.2 主要试剂与仪器

RNA 快速提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶和 100 bp DNA ladder marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司; 核酸琼脂糖凝胶电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司 PowerPac Basic; 凝胶成像分析仪: 美国 Kodak 公司 GL212 Pro。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计

分析已报道的 BVDV 基因组序列, 将不同株进行比对, 根据 GenBank 中登录的 BVDV 1 型和 2 型毒株基因序列 (序列号: M31182.1、AF502399.1) 选择包含 5' UTR 区高保守区域基因作为靶基因, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 组引物, 建立双重 RT-PCR 检测方法。

表 1 用于扩增 5' UTR 区高保守区域 2 组引物序列及位置

Tab.1 Sequences and location of 2 pairs of primers used for amplification of highly conservative sequences in the 5' UTR of BVDV1 and BVDV2 genes

编号 No.	序列 Sequences	位置/bp Location	长度/nt Length
引物 1 Primer 1	BVDV1-F 5'-ACAGGGTAGTCGTCAGTGGTT-3'	98	151
	BVDV1-R 5'-CCCTATCAGGCTGTATTCTGTA-3'	248	
引物 2 Primer 2	BVDV2-F 5'-TGGTGAGTTCCGTTGGATGGC-3'	65	303
	BVDV2-R 5'-CCCCGACGGGTTTTGTTTG-3'	358	

1.3.2 病毒 RNA 提取

对牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛副流感病毒 3 型(BPIV3)、猪瘟病毒(CSFV)、乙型脑炎病毒(JEV)、正常 BT 细胞按照 RNA/DNA 快速提取试剂盒操作方法进行 RNA/DNA 提取。提取后的 RNA 立即进行 cDNA 的合成,剩余的 RNA 及 DNA 冻存于 -70℃ 冰箱备用。

1.3.3 反转录

通过对随机引物及 AMV 反转录酶浓度进行优化,确定反转录体系为:5 × RNA PCR buffer 2.5 μL, dNTPs mixture 2.5 μL, RNase Free ddH₂O 9.5 μL, 随机引物 1 μL, RNase Inhibitor 1 μL, AMV 反转录酶 0.5 μL, 病毒 RNA 8 μL。反应条件为:37℃, 90 min; 42℃, 15 min; 95℃, 5 min。获得 cDNA, 保存备用。

1.3.4 RT-PCR 检测方法的建立

以获得的 BVDV1 和 BVDV2 质粒为模板进行 PCR 扩增。对 2 组引物 PCR 反应体系的 dNTPs 浓度、10 × buffer 浓度、Taq HS 酶浓度、引物、模板量及反应体系的退火温度及循环次数等进行优化,通过对正常 BT 细胞、BVDV1、BVDV2 进行 PCR 扩增来确定 RT-PCR 反应的最佳模式^[6]。

1.3.5 RT-PCR 产物的检测

取 5 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)进行电泳鉴定。电泳缓冲液为 1 × TAE buffer(0.04 mol/L Tris-乙酸, 0.001 mol/L EDTA, pH 8.0), 110 V 电泳 30 min, 在紫外成像仪下观察 PCR 产物条带在凝胶中的位置, 以 100 bp DNA ladder marker 为参照物, 判定结果。RT-PCR 阳性扩增片段进行测序, 通过与 GenBank 中 BVDV1 和 BVDV2 序列进行比对以确定 PCR 检测的准确性^[6]。

1.3.6 特异性试验

用 2 组引物分别以正常 BT 细胞、BVDV1 质粒标准品、BVDV2 质粒标准品、牛副流感病毒 3 型(BPIV3)、猪瘟病毒(CSFV)、乙型脑炎病毒(JEV) cDNA 为模板, 用所建立的 PCR 方法进行扩增, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定^[6]。

1.3.7 敏感性试验

将起始浓度为每微升 8.87×10^{10} 拷贝和 6.31×10^{10} 拷贝的 BVDV1 和 BVDV2 质粒样本做系列倍比稀释, 分设 10^{-3} 到 10^{-9} 共 7 个浓度梯度进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,

判断所能扩增的最小 DNA 质粒模板浓度^[6]。

1.3.8 稳定性和重复性实验

BVDV1 和 BVDV2 质粒及同一批 PCR 检测试剂于 -30℃ 冰箱放置 3 个月、6 个月、12 个月时, 进行 PCR 检测。3 次试验各做 3 个重复。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定^[5]。

1.3.9 方法的应用及验证

BVDV1、BVDV2、正常 BT 细胞、2 份已知 BVDV 阴性对照牛血清、64 份牛肛拭子样本(编号: g1 ~ g64)、41 批次人用牛源生物制品及原材料样本(编号: Ny1 ~ Ny41), 具体信息见表 2。同时提取 RNA, 反转录, 用 2 组引物进行 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定。

扩增到的阳性样品, 需要对可见的特异性目的条带进行纯化测序。测序结果经 BLAST 分析, 与 GenBank 中 BVDV1 和 BVDV2 核酸序列进行比对, 验证检测结果的准确性。

2 结果

2.1 PCR 反应条件优化

通过对 2 组引物 PCR 反应条件及反应体系的优化, 确定了 PCR 最佳反应体系为: 10 × Ex Taq buffer(含 Mg^{2+}) 2 μL, dNTPs mixture(10 mmol/L) 2 μL, Taq HS 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 上下游引物(10 pmol/μL) 各 1 μL, DNA 2 μL, 补水至 20 μL; PCR 最佳反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 再延伸 5 min。

2.2 PCR 产物的检测及特异性实验

2 组引物特异性实验显示, 以 BVDV1 质粒和 BVDV2 质粒为模版有明显目的条带出现, 以 BPIV3、CSFV、JEV 及正常 BT 细胞的 cDNA 为模版, 均无目的条带出现(见图 1)。结果显示特异性可以达到 100%。

2.3 检测结果的准确性

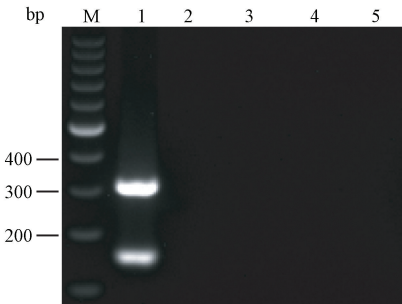
选择引物 1 和引物 2, PCR 扩增 BVDV 1 型和 BVDV 2 型阳性片段进行测序, 测序结果经 BLAST 分析, 与 GenBank 中 BVDV 1 型和 BVDV 2 型核酸序列同源性均为 99%, 说明该方法检测准确性较好。

2.4 敏感性试验

图 2 结果显示 2 组引物检测病毒 DNA 浓度均可以达到每微升 10^2 拷贝。

表 2 41 批次牛源样本信息
Tab.2 Information of 41 bovine-derived samples

单位编号 Manufacturer No.	样品名称 Sample names	样品数量(批次) Sample quantities (batches)	样品编号 Sample No.
1	小牛血清去蛋白提取液 Deproteinized calf serum extract	9	Ny1 ~ Ny9
	小牛血清 Bovine calf serum	6	Ny10 ~ Ny15
2	小牛血清 Bovine calf serum	2	Ny16 ~ Ny17
3	小牛血清 Bovine calf serum	1	Ny18
4	小牛血清 Bovine calf serum	1	Ny19
5	脾多肽注射液 Lienal polypeptide injection	3	Ny20 ~ Ny22
6	小牛血清去蛋白提取液 Deproteinized calf serum extract	1	Ny23
7	小牛血清 Bovine calf serum	4	Ny24 ~ Ny27
8	小牛血清 Bovine calf serum	6	Ny28 ~ Ny33
9	小牛血清 Bovine calf serum	1	Ny34
10	重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液 Recombinant bovine basic fibroblast growth factor eye drops	1	Ny35
11	小牛血清 Bovine calf serum	1	Ny36
12	小牛血清 Bovine calf serum	2	Ny37 ~ Ny38
13	小牛血清 Bovine calf serum	1	Ny39
14	小牛血清 Bovine calf serum	2	Ny40 ~ Ny41



注:M;100 bp DNA ladder marker;1:BVDV;2:BT 细胞对照;
3:BPIV3;4:CSFV;5:JEV。

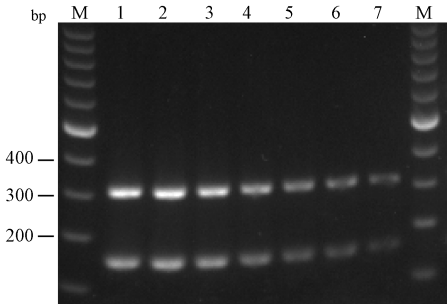
图 1 引物特异性验证

Note. M: 100 bp DNA ladder marker; 1: BVDV; 2: BT cells for control; 3: BPIV3; 4: CSFV; 5: JEV.

Fig.1 Specificity validation of the primers

2.5 稳定性和重复性实验

电泳结果显示,BVDV 质粒标准品在 -30℃ 冰箱放置 3 个月、6 个月、12 个月时,用 2 组引物进行



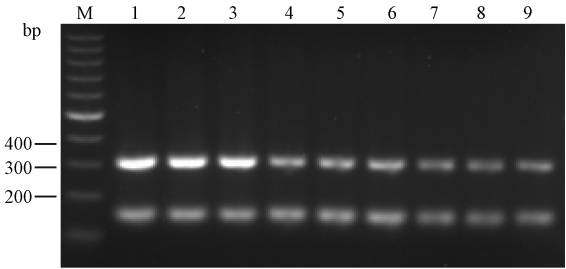
注:M;100 bp DNA ladder marker;1~7:10⁻³ ~ 10⁻⁹ 稀释。

图 2 通过 BVDV 质粒浓度梯度测定 2 对引物
PCR 检测敏感性

Note. M: 100 bp DNA ladder marker; 1 - 7: 10⁻³ - 10⁻⁹ dilution.

Fig.2 Sensitivity of 2 pairs of primers determined
by BVDV plasmid in gradient concentration

检测,分别能扩增出约 151 bp 和 303 bp 可见目的条带(图 3)。



注:M:100 bp DNA ladder marker;1~3: -30℃冰箱放置3个月的质粒标准品;4~6: -30℃冰箱放置6个月的质粒标准品;7~9: -30℃冰箱放置12个月的质粒标准品。

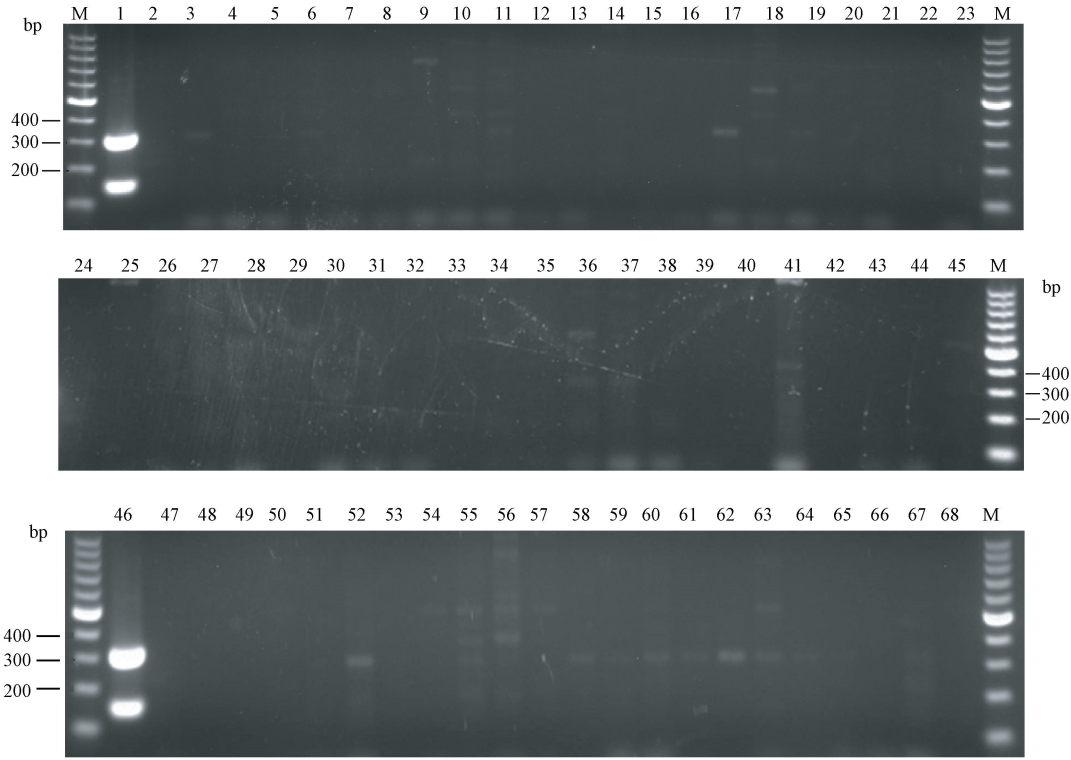
图3 2组引物PCR检测稳定性

Note. M: 100 bp DNA ladder marker; 1-3: Plasmid standard sample stored at -30℃ for 3 months; 4-6: Plasmid standard sample stored at -30℃ for 6 months; 7-9: Plasmid standard sample stored at -30℃ for 12 months.

Fig.3 Stability of the 2 pairs of primers

2.6 对牛肛拭子样本检测

对64份牛肛拭子样本(编号:g1~g64)进行检测,电泳结果显示有19份肛拭子样本(编号:g1、g4、g9、g15、g17、g34、g35、g43、g48、g51、g54~g61、g63)



注:M:100 bp DNA ladder marker;1,46:BVDV;2,47:BT细胞;3~23:g1~g21;24~45:g22~g43;48~68:g44~g64。

图4 PCR检测64份牛肛拭子样本(g1~g64)电泳结果

Note. M: 100 bp DNA ladder marker; 1, 46: BVDV; 2, 47: BT cells; 3-23: g1-g21 bovine anal swab samples; 24-45: g22-g43 bovine anal swab samples; 48-68: g44-g64 bovine anal swab samples.

Fig.4 Results of electrophoresis of 64 bovine anal swab samples (g1-g64) detected by the PCR method

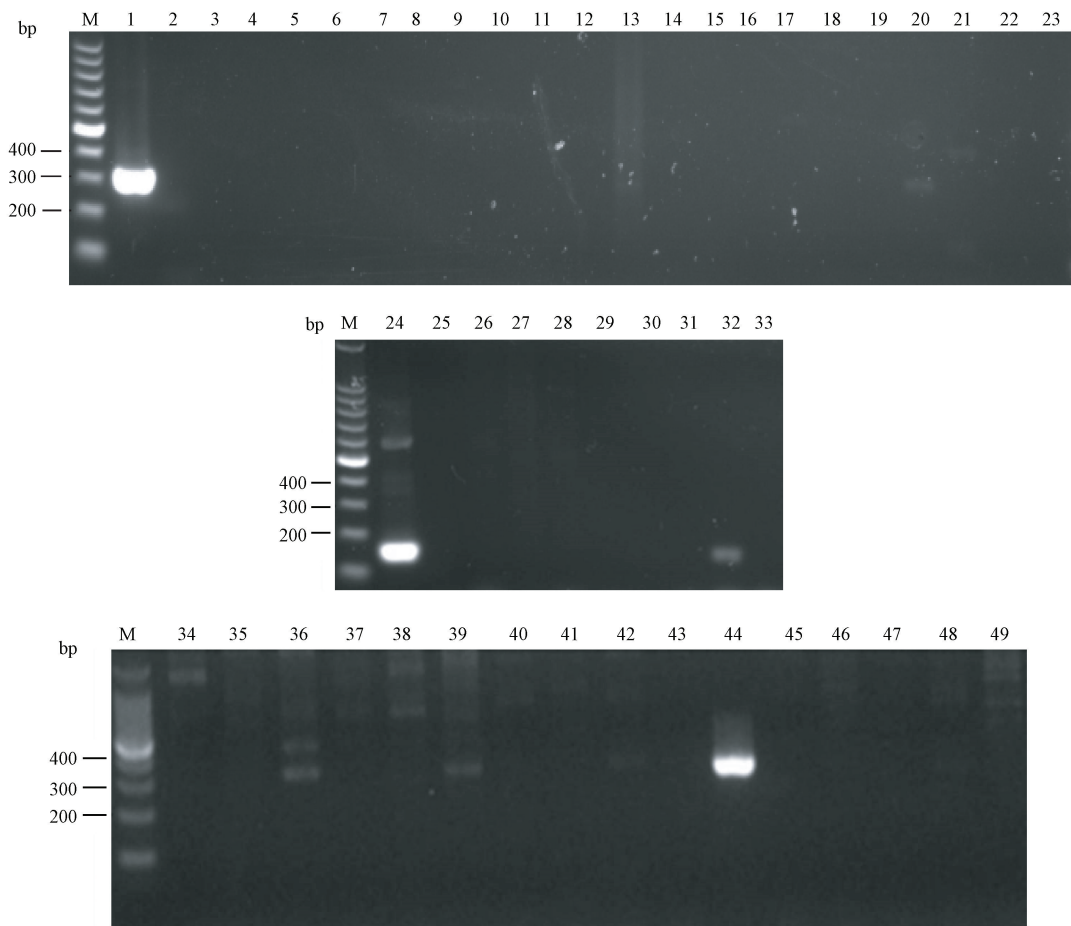
扩增出约303 bp的可见目的条带,正常BT细胞和其他45份牛肛拭子样本未扩增出可见目的条带。样本电泳结果见图4。

2.7 对牛源性样本进行病毒检测

对41批次牛源样本进行BVDV1和BVDV2病毒检测,有5批次牛源样本(编号:Ny16、Ny29、Ny32、Ny35、Ny41)扩增出约303 bp的可见目的条带,有1批次牛源样本(编号:Ny26)扩增出约151 bp的可见目的条带,其他35批次牛源样本未扩增到可见目的条带。样本电泳结果见图5。

2.8 检测结果的验证

将1型BVDV和2型BVDV与GenBank中BVDV1和BVDV2标准株核苷酸序列进行比对,其同源性均为99%;BVDV2核酸阳性样本g1、g4、g9、g15、g17、g34、g35、g43、g48、g51、g54~g61、g63、Ny16、Ny29、Ny32、Ny35、Ny41扩增产物纯化测序,与GenBank中BVDV2标准株核苷酸序列进行比对,其同源性均在95%以上;BVDV1核酸阳性样本Ny26扩增产物纯化测序,与GenBank中BVDV1标准株核苷酸序列进行比对,其同源性为98%。检测



注:M;100 bp DNA ladder marker;1,44: 2 型 BVDV;2,25,43;BT 细胞;3~4;阴性牛血清对照;5~23;Ny1~Ny19 牛源样本;24;1 型 BVDV;26~33;Ny20~Ny27;34~42;Ny28~Ny36;45~49;Ny37~Ny41。

图 5 PCR 检测 41 批次牛源样本(Ny1~Ny41)1 型和 2 型 BVDV 病毒的电泳结果
Note. M: 100 bp DNA ladder marker; 1, 44: BVDV2; 2, 25, 43: BT cells; 3~4: Negative bovine serum control; 5~23: Ny1~Ny19 bovine-derived samples; 24: BVDV1; 26~33: Ny20~Ny27 bovine-derived samples; 34~42: Ny28~Ny36 bovine-derived samples; 45~49: Ny37~Ny41 bovine-derived samples.

Fig.5 Results of electrophoresis of BVDV1 and BVDV2 in 41 bovine-derived samples (Ny1~Ny41) detected by the PCR method

结果显示牛肛拭子样本阳性率为 29.69% (19/64), 牛源样本阳性率为 14.6% (6/41)。

3 讨论

BVDV 是牛感染率较高、危害性较大的传染病病原之一,国内外已建立了多种检测方法,包括血清学及 PCR 检测方法等^[2, 3, 7-9]。但未见有针对牛源制品及牛源制品原辅材料外源 BVDV 检测的报道,中华人民共和国药典亦没有关于牛源制品及原辅材料检测的规定^[10]。药典在“新生小牛血清检测”中虽然有关于新生牛血清用细胞接种法和免疫荧光法检测病毒的规定^[10],但没有更为敏感特异的分子生物学检测方法,针对人用牛源性材料及人用牛源性生物制品的检测还是空白。

本研究检测了国内外 4 个厂家人用生物制品成品(包括小牛血清去蛋白提取液、脾多肽注射液、重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液等)11 批次,结果均为阴性;检测国内外 10 个厂家用于生产人用牛源性生物制品的原料小牛血清及实验用小牛血清(包括胎牛血清)30 批次,阳性率为 20% (6/30)。6 批次 BVDV 核酸阳性小牛血清分别属于 5 个省市的 5 个厂家,BVDV 检出率为 50%。检测的 64 份牛肛拭子样本又来源另一省市,由此可见 BVDV 分布范围之广及对人用牛源性生物制品存在的潜在危险。

我们建立的 BVDV RT-PCR 检测方法,其目的主要是用于牛及人用牛源性生物制品、及人用牛源性生物制品原材料携带或潜在污染 BVDV 的检测,

如小牛血清去蛋白注射液、牛肉浸液、牛胆膏、牛骨粉、牛骨源性明胶;以及用于生产牛源制品的原材料,如牛血浆、牛组织、牛源细胞等。张淑琴等^[4]从送检的牛肾细胞(MDBK 细胞)中分离到 BVDV 病毒,本实验也在用于生产牛源生物制品的牛血浆中检测到 BVDV。说明用于牛源生物制品生产的原材料确实存在 BVDV 的污染。

为了保障人民用药的安全,最大限度地降低使用牛源性生物制品传播牛携带相关病毒的风险,我们建立了特异、敏感、操作简单的 RT-PCR 方法,用于牛及牛源性生物制品及其原辅材料携带外源病毒的检测,完善了 BVDV 的检测技术,为研发 BVDV RT-PCR 检测试剂盒奠定了基础,也为今后制定相关技术的国家标准,在全国范围内推动牛源制品生产企业开展牛源制品及原辅材料 BVDV 检测提供了技术支撑。

参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京:科学出版社,1997: 645-652.

[2] 李兆华. RT-PCR 技术在 BVDV 检测中的应用研究进展 [J]. 山东畜牧兽医,2010,31(2): 50-51.

[3] 郭锐,陈平,田永祥,等. 快速检测牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量 PCR 技术建立及应用 [J]. 湖北农业科学,2011,

50(8): 1640-1643.

[4] 张淑琴,谭斌,程世鹏. 牛病毒性腹泻病毒基因 2 型毒株的分离与鉴定 [J]. 中国动物传染病学报,2016,24(3): 83-86.

[5] Bazzocchi M, Bertolotti L, Giammarioli M, et al. Complete genome sequence of a bovine viral diarrhea virus subgenotype 1h strain isolated in Italy [J]. Genome Announc, 2017, 5(8): e01697-16.

[6] 王吉,付瑞,卫礼,等. 脑心肌炎病毒(EMCV)RT-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志,2013,23(7): 44-49.

[7] Baillargeon P, Arango-Sabogal JC, Wellemans V, et al. Determining bovine viral diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis infections in dairy cattle using precolostral blood [J]. Can Vet J, 2017, 58(4): 360-364.

[8] Toohey-Kurth K, Sibley SD, Goldberg TL. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera [J]. Biologicals, 2017, 47: 64-68.

[9] Zoccola R, Mazzei M, Carrozza ML, et al. A newly developed BVDV-1 RT-qPCR Taqman assay based on Italian isolates: evaluation as a diagnostic tool [J]. Folia Microbiol (Praha), 2017, 62(4): 279-286.

[10] 陈竺,邵明立,吴涪,等. 中华人民共和国药典 [S]. 2015 年版,三部(通则),新生牛血清检测要求,通则: 144.

[收稿日期]2017-05-11

(上接第 59 页)

参考文献:

[1] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析 [J]. 癌症进展,2013,11(1): 89-95.

[2] 李彩霞,曾星,黄羽,等. 猪苓及猪苓多糖协同卡介苗对膀胱癌大鼠模型腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志,2011,27(6): 514-517.

[3] 吴金生,王清明,郑传秋,等. 姜黄素对 N-甲基亚硝基脲诱发膀胱癌大鼠化学干预作用及机制分析 [J]. 中国实验动物学报,2017,25(5): 567-571.

[4] 秦桂芳. 猪苓汤干预 BCG 防治 MNU 致大鼠膀胱癌作用研究 [D]. 河北大学,2016.

[5] 田斌强,赵应梅,王德贵,等. 姜黄素对大鼠膀胱肿瘤的预防与治疗作用 [J]. 肿瘤,2011,31(11): 1004-1009.

[6] 赵雷佐. 卡介苗对大鼠膀胱肿瘤细胞作用机制的探讨 [D]. 青岛大学,2013.

[7] 刘晶,韩国梁,杨晓峰,等. Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗对大鼠膀胱癌免疫治疗的效果 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(2): 144-149.

[8] 田平贵,韩国梁,杨晓峰,等. 试验剂量 Ag85A 与 Ag85B DNA 疫苗对膀胱癌大鼠血液系统及肝功能的影响 [J]. 中国药物与临床,2009,9(5): 384-387.

[9] Langle YV, Belgorosky D, Prack McCormick B, et al. FGFR3 down-regulation is involved in bacillus Calmette-Guérin induced bladder tumor growth inhibition [J]. J Urol, 2016, 195(1): 188-197.

[10] Liu X, Dowell AC, Patel P, et al. Cytokines as effectors and predictors of responses in the treatment of bladder cancer by bacillus Calmette-Guérin [J]. Future Oncol, 2014, 10(8): 1443-1456.

[11] Svatek RS, Zhao XR, Morales EE, et al. Sequential intravesical mitomycin plus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive urothelial bladder carcinoma: translational and phase I clinical trial [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(2): 303-311.

[收稿日期]2017-05-10