

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.003

基于磁性纳米微球的 γ 干扰素酶联免疫检测方法建立 *

吴 飞 赵明娜 郭巧梅 娄加陶[△]

(上海交通大学附属胸科医院检验科 上海 200030)

摘要 目的:建立及评价使用磁性纳米微球作为固相载体的人 γ 干扰素(Interferon-gamma, IFN- γ)双抗体夹心酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测方法。**方法:**以杂化细乳液合成法制备磁性纳米微球,将其作为免疫检测的固相载体。将磁性微球与 IFN- γ 抗体进行偶联,建立基于磁性微球的 ELISA 检测方法,检测人 IFN- γ ,绘制 IFN- γ 标准曲线并进行方法学评价。**结果:**获得包被有人 IFN- γ 抗体的免疫微球,抗体偶联率为 54.5 %。用它建立 IFN- γ 的双抗体夹心的 ELISA 检测方法,检测范围为 0-1000 pg/mL,相关系数为 0.9996,灵敏度 23.2 pg/mL,功能灵敏度 0 pg/mL,批内和批间变异系数(Coefficients of Variance, CVs) < 8 %,检测总共需要 2 小时。**结论:**成功制备了 IFN- γ 免疫微球并建立了定量检测人 IFN- γ 的双抗体夹心磁珠酶联免疫方法。

关键词:磁性微球; γ 干扰素; 磁珠酶联免疫分析法

中图分类号:R446.61; Q64 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)18-3410-05

Establishment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Interferon-gamma Detection Based on Immunomagnetic Beads*

WU Fei, ZHAO Ming-na, GUO Qiao-mei, LOU Jia-tao[△]

(Department of Laboratory Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: To establish and evaluate a double Interferon-gamma (IFN- γ) antibody sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which was based on immunomagnetic beads for human IFN- γ detection. **Methods:** Magnetic nanoparticle were prepared through a hybrid miniemulsion method and coupled with human IFN- γ antibody as solid phase. IFN- γ Antibody was coupled to magnetic nanoparticle. ELISA based on immunomagnetic beads for human IFN- γ detection was established and evaluated. Then the standard curve was drawn and assay performance characteristics of the new method was evaluated. **Results:** Immunoparticles coated human IFN- γ antibody were obtained with a coupling efficiency of 54.5 %. Immunoparticles were used to establish the double IFN- γ antibody sandwich system with detection range of 0-1000 pg/mL, coefficient of correlation of 0.9996, sensitivity of 23.2 pg/mL, functional sensitivity of 0 pg/mL, and intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) < 8 %. The total test time was 2 hours. **Conclusions:** A sandwich ELISA was successfully established for quantitative IFN- γ detection based on immunomagnetic beads.

Key words: Magnetic particle; IFN- γ ; Immunomagnetic bead ELISA

Chinese Library Classification (CLC): R446.61; Q64 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)18-3410-05

前言

人 γ 干扰素(Interferon-gamma, IFN- γ)是人体免疫中重要的细胞因子,它是由人体受到病原体,如细菌、寄生虫、病毒、肿瘤细胞或它们的代谢产物刺激后活化 T 细胞、自然杀伤细胞等产生并释放的^[1,2]。人 IFN- γ 分子是由 143 个氨基酸组成的糖蛋白,以同源二聚体形式存在,分子量为 40 kDa,其结构比较稳定。它是一类分泌性蛋白,具有广谱抗病毒、抗肿瘤和诱导分化等^[3]免疫调节功能。在临床上,体外伽马干扰素释放试验(Interferon-gamma release assay, IGRA)中对 IFN- γ 的定量检测已经被证明是很好的结核感染的检测指标^[4-6],用于肺结核(尤其是潜

伏性结核感染)^[7-9]、结核性胸膜炎、结核性脑膜炎等疾病的诊断和预后评价有着非常重要的意义。现有美国 FDA 批准的两种 IGRA 方法对 IFN- γ 进行体外检测:一种是传统的酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),但是 IFN- γ 的 ELISA 需要多步加样、清洗,操作繁琐、费时,缺乏足够高的灵敏度;另一种是酶联免疫斑点法(Enzyme-linked immunospot, ELISPOT),ELISPOT 灵敏度高于 ELISA,能够达到单细胞检测^[10],但是需要先将外周血单核细胞从全血中提取出来并清洗,进行细胞计数,过程复杂,并且结果判读需要有经验的技术人员。由于 IFN- γ 检测在感染性疾病诊断尤其是结核中扮演重要角色,研究一种快速、简单、灵敏度高的 IFN- γ 定量检

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372193);上海申康医院发展中心临床科室能力建设项目(SHDC22014011);

上海市胸科医院科技发展基金重大重点项目(2014YZDC10100)

作者简介:吴飞(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:免疫检测,电话:18817821803, E-mail: wufei@sjtu.edu.cn

[△] 通讯作者:娄加陶, E-mail: loujiatao@126.com, 电话:021-22200000-1503

(收稿日期:2015-01-05 接受日期:2015-02-01)

测方法将很有必要。

免疫磁性纳米微球是由免疫活性分子(如抗原、抗体)结合在磁性微球上形成。纳米磁性微球具有很高的比表面积,磁球对抗体的装载量比其他介质高,并且磁球还具备快速磁分离的特性,所以磁球作为一种新型固相载体,在细胞分选、免疫检测、生物大分子分离纯化及靶向给药等生物医学领域迅速得到广泛应用^[11, 12]。

本研究拟使用纳米磁性微球为反应固相载体,制备 IFN- γ 抗体包被的磁性微球,采用双抗体夹心的抗原抗体反应模型,建立基于磁性纳米微球的 IFN- γ 酶联免疫定量测定检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

表面羧基修饰的超顺磁性微球(本课题组自制);IFN- γ 捕获抗体(AHC4432)和生物素标记的 IFN- γ 检测抗体(AHC4539)购于美国 Invitrogen 公司;偶联辣根过氧化物酶(HRP)的链霉亲和素(SA)购于美国 Vector labs 公司;IFN- γ 标准品(300-02)购于美国 Propeptech 公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、TMB 底物显色试剂盒、Micro BCA 定量检测试剂盒均购于美国 Thermo 公司;牛血清白蛋白(BSA)购于美国 Sigma 公司。

1.2 实验仪器

全自动酶标仪(Wallac Victor1400)购自美国 PE 公司;磁分离架、96 孔磁分离板购自上海奥润公司;漩涡混合仪(QT-1)购自上海琪特公司;水浴恒温振荡器购自江苏博莱特实验仪器厂;微量振荡器(ZW-A)购自江苏金坛科析仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫微球制备(化学交联法) (1)平衡:按照课题组提出的杂化细乳液合成法制备表面羧基修饰的超顺磁性微球^[13-15](简称磁珠),取 2 mg 磁珠用 MEST 缓冲溶液(10 mM, pH7.6) 400 μ L 洗涤三次,重悬于 400 μ L MEST 缓冲溶液中;(2)羧基磁珠活化:向磁珠中加入的 50 mg/mL 的 EDC 和 NHS 各 200 μ L,混匀后室温旋转混合仪上活化 15 min,用于活化磁珠表面的羧基官能团,400 μ L MEST 缓冲溶液洗三遍除去多余的 EDC 和 NHS;(3)偶联抗体:向对照管加 400 μ L MEST 溶液,试验管加 IFN- γ 捕获抗体(1 mg/mL)20 μ L, MEST 稀释至 400 μ L,4 $^{\circ}$ C 旋转混合仪上偶联 2 h;(4)封闭:磁化取出上清,上清保留做 Micro BCA 蛋白定量测试。偶联好的磁珠加 400 μ L 封闭液(含 0.3%甘氨酸,0.5%BSA 的 10 mM PBS 缓冲液, pH7.6)洗 3 次,最后加 400 μ L 封闭液室温旋转混合仪上封闭 45 min,封闭磁珠上剩余活化的羧基;封闭后弃上清,取 400 μ L 保存液(含 0.05 %Tween-20,0.1%BSA 的 10 mM PBS 缓冲液, pH7.6)洗 3 次,最后加入 200 μ L 保存液(磁珠浓度 10 mg/mL)4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 磁性微球包被抗体量计算 磁性微球偶联抗体的过程中,当偶联结束后,在外加磁场的作用之下进行磁分离,得到包被后含有多余抗体的上清液,10000 r/min 离心 10 min 除去少量未被外磁场吸附的磁球。采用微量二喹啉甲酸(Micro BCA)蛋白定量检测试剂盒的说明建立蛋白浓度标准曲线,同时测抗体偶联后上清液中 IFN- γ 抗体的浓度,利用差减法计算包被在

磁性微球上抗体的质量,根据加入抗体的质量计算偶联率。

1.3.3 磁珠酶联免疫方法 IFN- γ 步骤 依次向酶标孔中加入 30 μ g 包被 IFN- γ 抗体的免疫磁球,100 μ L 的 IFN- γ 标准品溶液(浓度分别为 0、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250、500、1000 pg/mL)和 50 μ L 生物素标记检测抗体稀释液溶液(0.4 mg/mL, 1000 倍稀释),微量振荡器混匀片刻后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱反应 1 h 后,将酶标板置于磁板上进行磁分离,弃上清,每孔加入 100 μ L 偶联 HRP 的 SA(1 mg/mL, 10000 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min, Tris-HCl(0.02 M pH 7.4)洗涤 4 遍,磁分离,弃上清。向洗涤后的磁球中加入 100 μ L TMB 显色底物,常温反应 15 min,磁分离后转移 80 μ L 到白色酶标板中,加入 20 μ L 4M 的 H₂SO₄ 终止反应,上机检测 450 nm 时的 OD 值,绘制标准曲线。过程如图 1 所示:

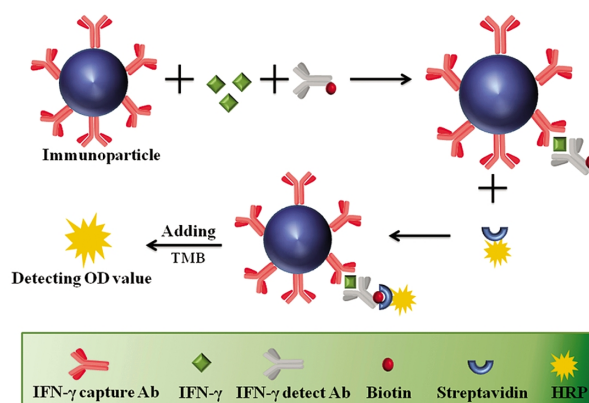


图 1 基于纳米磁性微球的 IFN- γ 酶联免疫检测方法流程图(双抗体夹心法)

Fig.1 Diagrammatic representation of IFN- γ detection using the immunomagnetic bead ELISA technology (A double Ab sandwich immunoassay)

1.3.4 灵敏度验证 最低检测限的确定:将零浓度标准品重复检测 10 次,计算出在 450 nm 处吸光度的平均值(OD₄₅₀)及其标准差(SD),OD₄₅₀+2SD 得到的值代入标准曲线计算出浓度值,即为最低检测限。

功能灵敏度检测: 将 IFN- γ 标准品按 7.8 pg/mL -1000 pg/mL 浓度范围做倍比稀释,用建立的基于磁珠的双抗体夹心酶联免疫法测定其 OD 值,每个浓度值做 10 个重复,计算每个浓度的均值(Mean)、标准差(SD)和变异系数(CV),CV 最接近 10%的样本所对应的 IFN- γ 浓度即为功能灵敏度(FS)。

1.3.5 精密度检测 为了研究此方法的稳定性和可靠性,分别取低、中、高三种不同浓度水平的 IFN- γ ,做批内和天间重复测定来评价精密度。批内不精密度(CV of intra-assay)是在一天内将三种水平 IFN- γ 分别进行 10 次重复测试,计算变异系数;批间不精密度(CV of intre-assay)是每天做一次评价样品,累计做 10 次,计算变异系数。

2 结果

2.1 免疫磁性微球的表征

使用杂化细乳液合成法制备磁性微球平均粒径约 500 nm 且尺寸均一,内部深黑色圆形由很多粒径 10 nm 的超顺磁性

Fe_3O_4 颗粒聚集组装而成(图 1A)。由动态光散射粒度仪测定,磁性微粒的水力学尺寸为 660 nm(图 1B),且粒径单分散性好。

包被抗体后,磁性微球的水力学尺寸增大到了 805 nm(图 1C),初步证明抗体已经固定在磁性微球上。

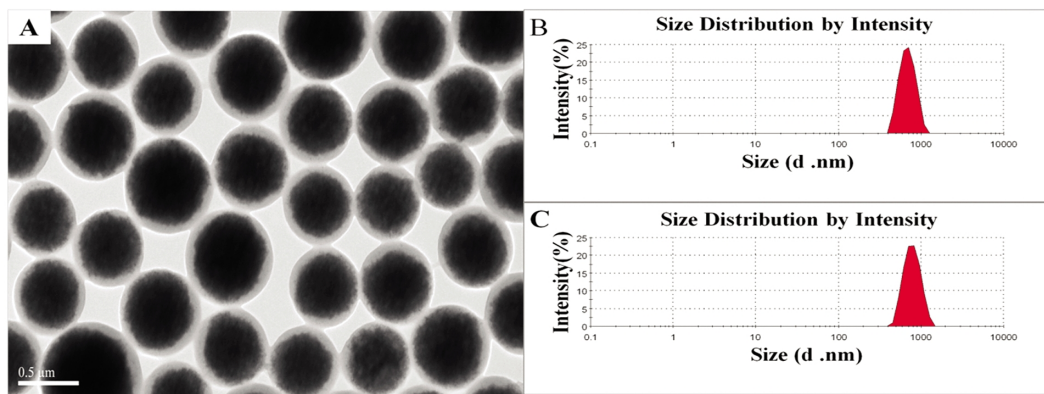


图 2 磁性微球的透射电镜图(A)和结合抗体前(B)、后(C)水力学尺寸变化

Fig.2 (A) TEM images of the magnetic particles. (B) The hydraulics size of the magnetic particles. (C) The hydraulics size of the magnetic particles after combined with antibody.

2.2 磁性微球包被结果

经 EDC/NHS 的活化,抗体分子上的氨基和磁性微球表面的羧基发生缩合反应形成肽键而牢固的连接。2 mg 磁性微球加入 20 μL INF- γ 捕获抗体(1 mg/mL),偶联得到免疫微球后,磁球表面包被抗体量为 10.9 μg ,抗体偶联率为 54.5 %,包被量高。

2.3 IFN- γ 标准曲线的绘制

对建立的 IFN- γ 标准曲线进行线性拟合,本检测方法的线性范围为 0-1000 pg/mL,标准曲线线性公式为 $y=0.001x+0.0686$,相关系数 $R^2=0.9996$,线性好,线性范围宽。如图 3 所示:

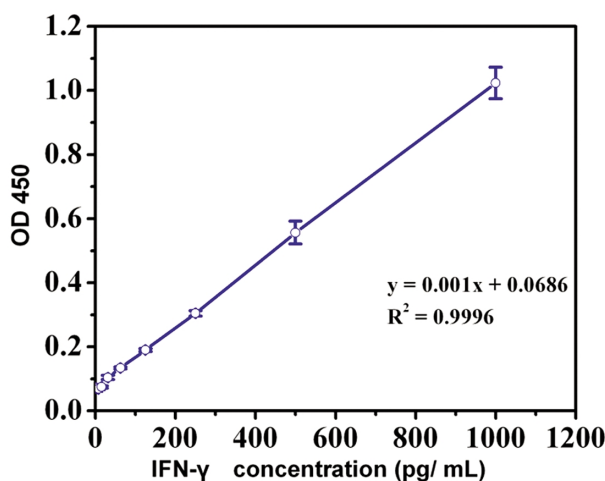


图 3 基于磁珠 ELISA 的 IFN- γ 检测方法标准曲线($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=10$, pg/mL)

Fig.3 Calibration curve of IFN- γ detection using the immunomagnetic bead ELISA technology($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=10$, pg/mL)

2.4 检测灵敏度

最低检测限:以零浓度标准品作为样本检测,重复测定 10 次,得出的 OD 值如图 4 所示,最低检测线为 23.2 pg/mL。

功能灵敏度:以 CV 为 10%为标准,根据免疫检测方法功

能灵敏度的计算方法,如图 5 所示,CV 最接近 10%是 0 pg/mL 时($\text{CV}=13.4\%$),其余测试点 CV 都远小于 10%。本实验建立的磁性微球酶联免疫方法检测的功能灵敏度是 0 pg/mL,性能非常好。

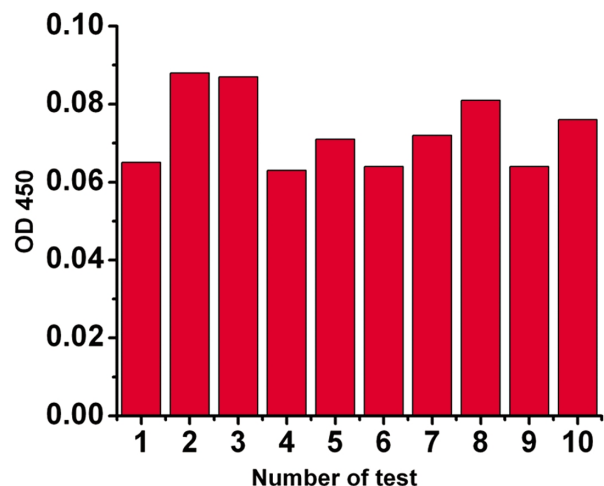


图 4 基于磁珠 ELISA 的 IFN- γ 检测方法标准曲线灵敏度检测结果
Fig.4 Detection sensitivity analysis of IFN- γ sandwich immunomagnetic bead based ELISA technology

2.5 精密度计算

精密度是衡量免疫检测体系稳定性的一个重要指标。按照步骤 1.3.5 所述方法,对我们建立的方法进行精密度分析,结果如表 1 所示:批内变异系数小于 6 %,批间变异系数小于 8 %,符合国家免疫学检测的评价标准($\leq 15\%$)^[6],说明此方法稳定性比较好,重复性好。

3 讨论

IFN- γ 的产生和释放是监测人体感染、免疫、肿瘤的重要指标,尤其是 IFN- γ 体外释放试验是临床常规开设的检测指标,对结核感染的诊断、治疗检测具有重要意义^[7]。及时准确的检

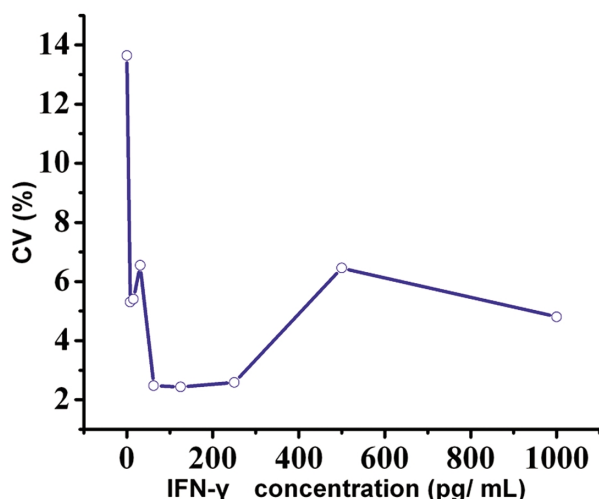
图5 基于磁珠 ELISA 的 IFN- γ 检测方法功能灵敏度检测图

Fig.5 Functional sensitivity of IFN- γ detection using the immunomagnetic bead ELISA technology

测 IFN- γ 对疾病的诊断和治疗有着重要的意义。目前在临床诊断应用中, IFN- γ 体外释放试验主要采取 FDA 批准的国外进口试剂盒^[18]结核感染的临床检测提供可靠的依据,但是这些试剂非常昂贵,操作较为复杂,难以推广和普及应用。国内 IFN- γ 检测和 IFN- γ 体外释放试验主要采用传统的 ELISA 方法,需要

多步加样、多次洗涤导致试验的 CV 较大,缺乏足够高的灵敏度和稳定性。

目前, 纳米磁性微球作为一种新型结构的功能高分子材料,已经越来越广泛的应用于生物医药、临床医学以及其他众多领域在疾病诊断方面,基于磁性纳米颗粒的诊断技术具有以下优势^[19]:(1) 反应动力学优越:磁性纳米颗粒比表面积大,大大缩短了检测时间;(2) 磁分离快速、可自动化:减少了大量的清洗和显色步骤,提高检测准确度,缩短检测时间;(3)低背景:生物体系大多不具有磁性,所以天然的背景干扰小,灵敏度高。本研究将酶联免疫方法的特异性和磁分离技术的快速性结合在一起,建立一种基于磁性纳米颗粒的酶联免疫分析方法。实验以包被有 IFN- γ 捕获抗体的磁性微球为固相载体,采用 HRP 催化 TMB 显色为检测体系,建立了稳定的磁酶免双抗体夹心法对样品中的 IFN- γ 进行定量检测方法。该方法在 0-1000 pg/mL 浓度范围内检测线性良好,标准曲线线性公式为 $y=0.001x+0.0686$,相关系数为 0.9996,最低检出限可达 23.2 pg/mL。磁性微粒替代传统的酶标板作为固相载体,具体比表面积大反应更快速充分,表面易修饰,易分离的显著优点,近年来已经越来越多的应用于免疫检测领域^[20-23]。磁酶免的检测方法比传统的 ELISA 方法操作简单(只需要一步清洗),检测时间更短(2 h),重现性很好,并且有很大的快速、自动化、高通量、多指标检测的应用前景。

表 1 基于磁珠 ELISA 的 IFN- γ 检测方法精密度检测结果Table 1 The precision of IFN- γ sandwich immunomagnetic bead based ELISA technology

Quality control (n=10)	Average measured value (OD 450 nm)		CV	
	Intra-assay (Mean $\pm$ SD)	Inter-assay (Mean $\pm$ SD)	Intra-assay (%)	Inter-assay (%)
Low	0.074 $\pm$ 0.004	0.077 $\pm$ 0.006	5.40	7.70
Middle	0.304 $\pm$ 0.008	0.301 $\pm$ 0.014	2.58	4.49
High	1.023 $\pm$ 0.049	1.013 $\pm$ 0.036	4.81	3.55

参考文献(References)

- [1] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions[J]. J Leukocyte Biol, 2004, 75(2): 163-189
- [2] Li Q, Han A-c, Zheng B, et al. Basic Research of Interferon and Its Application Progress [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 2 047
- [3] Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- γ in cancer[J]. Clin. Cancer Res., 2011, 17(19): 6118-6124
- [4] Diel R, Lodenkemper R, Nienhaus A. Predictive Value of Interferon-gamma Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Progression From Latent TB Infection to Disease State A Meta-analysis[J]. Chest, 2012, 142(1): 63-75
- [5] Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Clinical microbiology reviews, 2014, 27(1): 3-20
- [6] Mardani M, Abtahian Z. New Advances in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: A Review [J]. Arch Pediatr, 2015, 3 (1): e22368
- [7] Goletti D, Ferrara G, Kampmann B, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis (vol 37, pg 88, 2011) [J]. European Respiratory Journal, 2012, 39(3): 793-793
- [8] Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research [J]. Annals of internal medicine, 2007, 146(5): 340-354
- [9] Dutta NK, Karakousis PC. Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms [J]. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2014, 78(3): 343-371
- [10] Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay [J]. Methods, 2006, 38(4): 274-282
- [11] Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review [J]. Rep Prog Phys, 2015, 78(1): 016601

- [12] Huang S-H, Juang R-S. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review [J]. J Nanopart Res, 2011, 13(10): 4411-4430
- [13] Cui L, Xu H, He P, et al. Developing a hybrid emulsion polymerization system to synthesize Fe₃O₄/polystyrene latexes with narrow size distribution and high magnetite content [J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2007, 45 (22): 5285-5295
- [14] Dai X, Xu H, Zhang X, et al. Determination of the affinity constant of streptavidin-coupled magnetic particles and a biotinylated antibody for high performance of magnetic solid carrier in immunoassays[J]. Materials Science and Engineering: C, 2014, 34 422-428
- [15] Dai X, Xu H, Li Y, et al. Influence of the physical and chemical properties of magnetic nanoparticles on their performance in a chemiluminescence immunoassay [J]. Clin Biochem, 2014, 47 (3): 220-226
- [16] 杜海平. 基于金磁微粒的化学发光免疫学检测吗啡方法的建立 [D]. 西北大学, 2012
Du Hai-ping. GoldMag Particles-Based Chemiluminescence Immunoassay for Detection of Morphine [D]. Northwest University, 2012
- [17] Diel R, Goletti D, Ferrara G, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis [J]. European Respiratory Journal, 2011, 37(1): 88-99
- [18] Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON (R)-TB gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States [J]. Morbidity and mortality weekly report, 2005, 54(RR15): 49-55
- [19] 殷实, 古宏晨, 徐宏. 基于磁性纳米颗粒磁学信号的生物检测技术 [J]. 生物医学工程学杂志, 2013, 30(4): 870-883
Yin Shi, Gu Hong-chen, Xu Hong. Bio-detection Techniques Based on Magnetic Signal of Nanoparticles [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2013, 30(4): 870-883
- [20] Ivanova T, Godjevargova T. Sensitive Progesterone Determination using a Magnetic Particle-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay[J]. Anal Lett, 2014
- [21] Xu Q, Xu H, Gu H, et al. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I [J]. Materials Science and Engineering: C, 2009, 29(3): 702-707
- [22] Kim C-B, Choi YY, Song WK, et al. Antibody-based magnetic nanoparticle immunoassay for quantification of Alzheimer's disease pathogenic factor[J]. J Biomed Opt, 2014, 19(5): 051205-051205
- [23] Zhang P, Lu H, Chen J, et al. Simple and Sensitive Detection of HBsAg by Using a Quantum Dots Nanobeads Based Dot-Blot Immunoassay[J]. Theranostics, 2014, 4(3): 307

(上接第 3409 页)

- [13] Yang Y Q, Chen H P, Wang Y, et al. Considerations for use of acupuncture as supplemental therapy for patients with allergic asthma [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 44(3): 254-261
- [14] 赖敏, 王淑美, 汪莹, 等. 电针不同穴组对胃癌大鼠术后免疫功能的影响[J]. 针刺研究, 2008, 33(4): 245-249
Lai Min, Wang Shu-mei, Wang Yin, et al. Effects of electroacupuncture of "Zusanli" (ST 36), "Hegu" (LI 4) and / or "Sanyinjiao" (SP 9) on immunofunction in Gastric Carcinectomy Rats[J]. Acupuncture Research, 2008, 33(4): 245-249
- [15] Li G, Li S, Wang B, et al. The effect of electroacupuncture on postoperative immunoinflammatory response in patients undergoing supratentorial craniotomy[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(3): 699-702
- [16] 王家有, 潘三强, 宿宝贵. 神经-内分泌-免疫网络调节与针刺治病的关系 -- 针刺作用途径研究进展 [J]. 解剖学研究, 2003, 25(3): 229-232
Wang Jia-you, Pan San-qiang, Su Bao-gui. Relationship between Neuro-Endocrine-Immune network and acupuncture [J]. Anat Res, 2003, 25(3): 229-232
- [17] 乔鸿飞, 兰宾尚, 刘亦恒. 电针刺激对脊髓损伤大鼠免疫功能及 HPA 轴功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(9): 828-830, 840
Qiao Hong-fei, Lan Bin-shang, Liu Yi-heng. Effect on immune function and hypothalamus-pituitary-adrenal axis of electroacupuncture in adult rats with spinal cord injuries [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(9): 828-830
- [18] 卢咏梅, 张宏. 电针对运动性免疫抑制大鼠 HPA 轴的影响[J]. 世界针灸杂志, 2011, 21(02): 49-53
Lu Yong-mei, Zhang Hong. Effects of electroacupuncture on HPA axis in rats with exercise-induced immunosuppression [J]. World Journal of Acupuncture-Moxibustion, 2011, 21(02): 49-53
- [19] 司呈泉, 宿广峰, 许振国. 针刺足三里对腹部手术后胃肠功能的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2007, 13(6): 547-549
Si Cheng-quan, Su Guang-feng, Xu Zhen-guo. Effect of acupuncture on gastrointestinal function in patients undergoing abdominal surgery [J]. Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine, 2007, 13(6): 547-549
- [20] 邓晶晶. 针刺对腹部术后胃肠运动功能紊乱的调整作用及机理研究[D]. 广州中医药大学, 2010: 65
Deng Jing-jing. Study on Regulative Effects and its Mechanism of Acupuncture on abdominal postoperative gastrointestinal dysmotility [D]. Guangzhou university of chinese medicine, 2010: 65