

免疫色谱法从液体培养物中快速鉴定结核分枝杆菌复合群的效果评价

李静, 江渊, 张阳奕, 王莉莉, 武洁, 郁晨蕾, 朱国峰, 沈鑫

摘要: [目的] 评价两种免疫色谱法试剂盒[结核分枝杆菌复合群鉴定试剂盒、结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(胶体金法)]对分枝杆菌诊断系统(BACTEC MGIT 960 System)阳性培养物快速鉴定结核分枝杆菌复合群(MTBC)的临床价值。[方法] 对15株分枝杆菌标准菌株及418例BACTEC MGIT 960阳性培养物采用两种免疫色谱法试剂盒和传统生化法鉴定结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌。鉴定结果不一致的菌株,应用16S rRNA基因序列法进行检测。[结果] 以传统生化法为金标准,胶体金法鉴定结核分枝杆菌复合群的灵敏度为98.4%(253/257),特异度为99.4%(160/161),阳性预期值为99.6%(253/254),阴性预期值为97.6%(160/164);MGIT TBc ID试剂盒鉴定结核分枝杆菌复合群的灵敏度为98.4%(253/257),特异度为100%(161/161),阳性预期值为100%(253/253),阴性预期值为97.6%(161/165)。与传统生化法比较,2种方法的一致性分别是Kappa值0.975、0.980,两种方法的一致性均较好。5株鉴定结果不一致的菌株应用16S rRNA基因序列法检测结果分别为4株MTBC,1株诺卡氏菌。[结论] 胶体金法能快速鉴定结核分枝杆菌复合群,可用于BACTEC MGIT 960培养系统分枝杆菌培养阳性物的鉴定,适合在临床实验室开展。MGIT TBc ID试剂盒检测的准确性高,更适合应用在突发公共卫生检测。

关键词: 结核分枝杆菌复合群;MPB64蛋白;菌群鉴定;免疫色谱法

Evaluation of Immunochromatographic Assays for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Liquid Culture LI Jing, JIANG Yuan, ZHANG Yang-yi, WANG Li-li, WU Jie, YU Chen-lei, ZHU Guo-feng, SHEN Xin (Department of Tuberculosis Prevention and Control, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). Address correspondence to ZHU Guo-feng, E-mail: zhuguofeng@scdc.sh.cn; SHEN Xin, E-mail: shenxin@scdc.sh.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To evaluate the clinical application value of two immunochromatographic assay kits [*Mycobacterium tuberculosis* complex identification kit (MGIT TBc ID test) and *Mycobacterium tuberculosis* antigen assay kit (Capilia TB assay)] for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) in *Mycobacteria* testing system (BACTEC MGIT 960 System) positive cultures. [Methods] Reference mycobacterial strains ($n=15$) and BACTEC MGIT 960 System positive culture samples ($n=418$) were collected to apply two immunochromatographic assay kits and traditional biochemical method to identify MTBC and nontuberculous mycobacteria. Inconsistent identification results were confirmed by 16S rRNA gene sequencing. [Results] The traditional biochemical method was used as the gold standard. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of Capilia TB assay for MTBC detection were 98.4% (253/257), 99.4% (160/161), 99.6% (253/254), and 97.6% (160/164), respectively; those of MGIT TBc ID test were 98.4% (253/257), 100% (161/161), 100% (253/253), and 97.6% (161/165), respectively. Compared with the traditional biochemical method, the Kappa values of Capilia TB assay and MGIT TBc ID test were 0.975 and 0.980 respectively, indicating good consistency. The results of 16S rRNA gene sequencing for inconsistent strains were 4 strains of MTBC and 1 strain of *Nocardia*. [Conclusion] The Capilia TB assay represents a rapid, simple MT identification test that could be used to BACTEC MGIT 960 System positive cultures in clinical laboratories. The MGIT TBc ID test is more accurate and could be used in public health emergencies.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis* complex; MPB64 protein; species identification; immunochromatographic assay

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15164

[基金项目] 上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(编号:XYQ2011051);上海市卫生局课题(编号:20114073)

[作者简介] 并列第一作者。李静(1972—),女,硕士,副主任技师;研究方向:结核病及耐药结核病实验室检测;E-mail: lijing@scdc.sh.cn;江渊(1976—),女,博士,副主任医师;研究方向:结核病及耐药结核病实验室检测;E-mail: jiangyuan@scdc.sh.cn

[通信作者] 并列通信作者。朱国峰, E-mail: zhuguofeng@scdc.sh.cn; 沈鑫, E-mail: shenxin@scdc.sh.cn

[作者单位] 上海市疾病预防控制中心结核病防治科, 上海 200336

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)建议使用液体培养结合免疫色谱法对分枝杆菌进行快速菌群鉴定以满足结核分枝杆菌分离培养和药物敏感性试验的需求^[1]。目前我国已有部分实验室使用分枝杆菌诊断系统(BACTEC MGIT 960 System)进行分枝杆菌的分离培养和药物敏感性试验。经涂片确认抗酸染色阳性的BACTEC MGIT 960培养阳性物包括结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)和非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM),而BACTEC MGIT 960系统的药物敏感性试验仅适用于结核分枝杆菌复合群,在进行药敏试验之前对MGIT培养阳性物的菌群鉴定尤为重要。本文对15株分枝杆菌标准菌株和418例MGIT 960阳性培养物用两种免疫色谱法试剂盒[结核分枝杆菌复合群鉴定试剂盒(MGIT TBc Identification Test, MGIT TBc ID)和结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(胶体金法)]及传统生化法鉴定结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌,应用16S rRNA基因序列分析法复测不一致结果,以评价免疫色谱法在分枝杆菌快速菌群鉴定中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 标准菌株 分枝杆菌标准菌株15株:1株结核分枝杆菌标准菌株H37Rv(ATCC27294);14株非结核分枝杆菌标准菌株:戈登分枝杆菌(ATCC14470)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC12478)、胞内分枝杆菌(ATCC13950)、龟分枝杆菌(ATCC35749)、耻垢分枝杆菌(ATCC19420)、土地分枝杆菌(ATCC15755)、溃疡分枝杆菌(ATCC19423)、胃分枝杆菌(ATCC15754)、金色分枝杆菌(ATCC23366)、鸟分枝杆菌(ATCC25291)、瘰癧分枝杆菌(ATCC19981)、蟾蜍分枝杆菌(ATCC19250)、偶发分枝杆菌(ATCC6841)、不产色分枝杆菌(ATCC19530)由中国疾病预防控制中心结核病防治临床中心提供。

1.1.2 临床菌株 收集2013年6—12月上海市5家开展分枝杆菌液体培养的结核病定点医院(徐汇区八五分院、松江区中心医院、嘉定区中心医院、浦东新区南华医院、闵行区吴泾医院)的临床菌株418株。

1.2 主要仪器和试剂

传统生化法的主要实验试剂和配制方法参照《结核病诊断实验室检验规程》^[2]。MGIT TBc ID为美国碧

迪医疗器械有限公司产品,结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(胶体金法)为杭州创新生物检控技术有限公司产品,16S rRNA基因序列分析法的试剂与仪器包括聚合酶链式反应(PCR)仪、紫外凝胶成像仪(均购自美国Bio-Rad公司),PCR MasterMix购自天根生化科技公司,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,序列分析软件(Geneious 6.0.3)。

1.3 方法

1.3.1 传统生化法 使用噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基、对硝基苯甲酸(PNB)培养基和28℃生长试验进行分枝杆菌菌群鉴定。PNB培养基上不生长、TCH培养基上生长/不生长并且28℃培养4周不生长的菌株为结核分枝杆菌复合群,PNB培养基上生长/不生长、TCH培养基上生长和28℃培养4周生长的菌株为非结核分枝杆菌。

1.3.2 免疫色谱法 MGIT TBc ID试剂盒和胶体金法试剂盒检测原理和方法一致。①免疫层析法检测原理:试剂条由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成。胶体金垫内含胶体金标记的鼠抗MPB64单克隆抗体A,硝酸纤维素膜上包被固化的鼠抗MPB64单克隆抗体B(检测线)和抗鼠免疫球蛋白抗体(对照条线)。当样品从检测板样品孔滴下后,胶体金标记的鼠抗MPB64单克隆抗体A被溶解,则与样品中的抗原形成免疫复合物,免疫复合物因毛细管层析作用而移动,被检测线中固化的鼠抗MPB64单克隆抗体B捕获,在检测线因胶体金作用下形成紫红色条带,反之若样本中无MPB64蛋白则无条带产生。②检测方法:用一次性无菌吸管吸取100μL MGIT液体培养阳性物,滴加到检测板的加样孔中,室温孵育15 min判读结果,出现两条红色条带(质控带和检测带)者为阳性,仅出现质控带者为阴性,质控带未出现或无条带出现者为无效试验,需重新试验。结果在60 min内判定有效。③质量控制:结核分枝杆菌标准菌株H37Rv(ATCC27294)为阳性对照进行质控,堪萨斯分枝杆菌(ATCC12478)为阴性对照。

1.3.3 16S rRNA基因序列法 ①DNA模板的制备:采用煮沸裂解法进行提取^[3]。从罗氏培养基上刮取1~2接种环阳性培养物,重悬于200μL三羟甲基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)溶液中,80℃灭活30 min。灭活后的菌株DNA 100℃水浴10 min煮沸裂解,立即置冰上2 min,13 000×g离心15 min后,取上清置于另一无菌1.5 mL微量离心管(Eppendorf

tubes) 中, -20 ℃ 保存备用。② 16S rRNA 基因测序: 根据 16S rRNA 编码基因保守区设计通用引物。P1, 5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P2, 5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'。目的基因片段长度为 514 bp。PCR 反应体系 50 μL, PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 经过 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定。PCR 扩增产物由上海桑尼生物科技有限公司测序, 测序结果上传美国国立生物技术中心 (NCBI) 的基因数据库, 与微生物数据库中标准基因序列进行比对, 相似度达到 99% 以上者为 16S rRNA 基因测序的鉴定结果。每批实验设立阴性对照 (灭菌双蒸水) 和阳性对照 (H37Rv)。

1.4 相关定义

灵敏度又称真阳性率, 是指将实际有病的人正确地判定为真阳性的比例。 $\text{灵敏度} = \frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数} + \text{假阴性数}} \times 100\%$ 。

特异度又称真阴性率, 是指将实际无病的人正确地判定为真阴性的比例。 $\text{特异度} = \frac{\text{真阴性数}}{\text{真阴性数} + \text{假阳性数}} \times 100\%$ 。

阳性预期值是在诊断试验为阳性的受试者中, 标准诊断有病的病例 (真阳性) 所占的比例。 $\text{阳性预期值} = \frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数} + \text{假阳性数}} \times 100\%$ 。

阴性预期值是在诊断试验为阴性的受试者中, 标准诊断证实无病的受试者 (真阴性) 所占的比例。 $\text{阴性预期值} = \frac{\text{真阴性数}}{\text{真阴性数} + \text{假阴性数}} \times 100\%$ 。

1.5 统计学分析

用 Microsoft Excel 软件进行数据整理, 采用 SPSS 19.0 分析软件, 以传统生化法为金标准, 评价两种免疫色谱法试剂盒的敏感性、特异度、阳性预期值、阴性预期值, 方法一致性分析采用 *Kappa* 值计算。

2 结果

2.1 两种免疫色谱法试剂盒鉴定分枝杆菌标准株

1 株结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 用 MGIT TBc ID 和胶体金法检测均为阳性, 14 株非结核分枝杆菌标准菌株用两种免疫色谱法试剂盒检测均为阴性。见表 1。

2.2 两种免疫色谱法试剂盒鉴定 418 株临床菌株

2.2.1 胶体金法 传统生化法鉴定结核分枝杆菌复合群 257 例, 非结核分枝杆菌 161 例, 胶体金法检测阳性 254 例, 阴性 164 例。胶体金法鉴定结核分枝

杆菌复合群的灵敏度为 98.4% (253/257), 特异度为 99.4% (160/161), 阳性预期值为 99.6% (253/254), 阴性预期值为 97.6% (160/164)。两种方法的一致性 *Kappa* 值 = 0.975。见表 2。

表 1 分枝杆菌标准菌株应用胶体金法和 MGIT TBc ID 试剂盒鉴定结果

分枝杆菌标准菌株	胶体金法	MGIT TBc ID
结核分枝杆菌 (H37Rv)	阳性	阳性
戈登分枝杆菌	阴性	阴性
堪萨斯分枝杆菌	阴性	阴性
胞内分枝杆菌	阴性	阴性
龟分枝杆菌	阴性	阴性
耻垢分枝杆菌	阴性	阴性
土地分枝杆菌	阴性	阴性
溃疡分枝杆菌	阴性	阴性
胃分枝杆菌	阴性	阴性
金色分枝杆菌	阴性	阴性
鸟分枝杆菌	阴性	阴性
瘰癧分枝杆菌	阴性	阴性
蟾蜍分枝杆菌	阴性	阴性
偶发分枝杆菌	阴性	阴性
不产色分枝杆菌	阴性	阴性

表 2 临床菌株应用胶体金法与传统生化法鉴定结果

胶体金法	传统生化法				合计
	结核分枝杆菌复合群		非结核分枝杆菌		
	<i>n</i>	率(%)	<i>n</i>	率(%)	
阳性	253	98.4 ^a	1	0.6 ^b	254
阴性	4	1.6 ^c	160	99.4 ^d	164
总数	257	100.0	161	100.0	418

[注] a: 灵敏度; b: 假阳性率; c: 假阴性率; d: 特异度。

2.2.2 MGIT TBc ID 试剂盒 传统生化法鉴定结核分枝杆菌复合群 257 例, 非结核分枝杆菌 161 例, MGIT TBc ID 检测阳性 253 例, 阴性 165 例。MGIT TBc ID 试剂盒鉴定结核分枝杆菌复合群的灵敏度为 98.4% (253/257), 特异度为 100% (161/161), 阳性预期值为 100% (253/253), 阴性预期值为 97.6% (161/165)。两种方法的一致性 *Kappa* 值 = 0.980。见表 3。

表 3 临床菌株应用 MGIT TBc ID 与传统生化法鉴定结果

MGIT TBc ID	传统生化法				合计
	结核分枝杆菌复合群		非结核分枝杆菌		
	<i>n</i>	率(%)	<i>n</i>	率(%)	
阳性	253	98.4 ^a	0	0.0 ^b	253
阴性	4	1.6 ^c	161	100.0 ^d	165
总数	257	100.0	161	100.0	418

[注] a: 灵敏度; b: 假阳性率; c: 假阴性率; d: 特异度。

2.3 不一致结果分析

对鉴定结果不一致的5例菌株应用16S rRNA基因序列分析法进行进一步检测。16S rRNA基因序列测序有4例鉴定为结核分枝杆菌复合群,与传统生化法结果相符;1例传统生化法鉴定为非结核分枝杆菌,而胶体金法检测结果为阳性及MGIT TBc ID试剂盒检测结果为阴性的菌株,16S rRNA基因序列结果为诺卡氏菌。见表4。

表4 5例鉴定不一致结果的菌株应用16S rRNA基因序列测序结果

传统生化法	胶体金法	MGIT TBc ID	16S rRNA
结核分枝杆菌复合群	阴性	阴性	结核分枝杆菌复合群
结核分枝杆菌复合群	阴性	阴性	结核分枝杆菌复合群
结核分枝杆菌复合群	阴性	阴性	结核分枝杆菌复合群
结核分枝杆菌复合群	阴性	阴性	结核分枝杆菌复合群
非结核分枝杆菌	阳性	阴性	诺卡氏菌

3 讨论

免疫色谱法利用结核分枝杆菌能分泌MPB64特异性蛋白而非结核分枝杆菌不能形成MPB64蛋白从而达到鉴别功能^[4]。市场上已有多个不同品牌的免疫色谱法鉴定试剂盒,本研究中应用MGIT TBc ID和胶体金法两种品牌的免疫色谱法试剂盒对418例MGIT 960阳性培养物进行分枝杆菌菌群鉴定,与传统生化法比较,Kappa值分别为0.975和0.980,一致性都非常好。免疫色谱法与传统生化法比较,操作简便且快速,不需要额外的仪器,15 min即可以判读结果。

免疫色谱法鉴定阳性培养物中结核分枝杆菌复合群为98.4%,与国内外报道相近^[5-7]或高于一些报道^[8-12]。4例免疫色谱法检测MPB64蛋白为阴性的培养物用16S rRNA基因序列鉴定结果为结核分枝杆菌复合群,可能与结核分枝杆菌分离株MPB64编码基因发生突变或Rv1980c基因编码缺失有关^[6-7,13],还有研究表明某些卡介苗(BCG)菌株不能分泌MPB64蛋白^[6,9]而使得免疫色谱法检测出现假阴性结果,何霞等^[8]报道应用MPB64作为快速检测结核分枝杆菌生长指示的最小菌量为10⁻⁷~10⁻⁶ mg/mL,如果结核分枝杆菌分泌MPB64蛋白浓度达不到免疫色谱法的检测阈可能出现假阴性结果。因此建议培养报告阳性后37℃温箱继续放置3~5 d以增加分枝杆菌菌量,再进行免疫色谱法鉴定可以减少假阴性结果。1例临床菌株用16S rRNA基因序列鉴定为诺卡氏菌,本文中

采用两种免疫色谱法试剂盒检测MPB64蛋白出现相反结果,应用MGIT TBc ID试剂盒检测为阴性,这与报道相符^[5]。虽然有文献报道^[14]诺卡氏菌应用胶体金法检测为阴性,但本实验结果出现检测条带为阳性反应,原因可能在于:(1)菌株之间序列存在差异;(2)该试剂盒使用的抗原纯度不够而导致假阳性结果。这些有待进一步探讨。

美国生产MGIT TBc ID试剂盒和国产胶体金法试剂盒操作一样简单但成本远远高于国产试剂盒,虽然国产胶体金法检测出1例假阳性,但灵敏度和特异度及一致性都非常好。用结核分枝杆菌抗原胶体金法与BACTEC MGIT 960培养系统配合做结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌的鉴定既经济实用又操作简单,也能极大缩短检测时间,适合在临床实验室开展。MGIT TBc ID试剂盒则因其检测准确性更高,适合应用在突发公共卫生事件的应急检测。

免疫色谱法鉴定技术特异度强、灵敏度高、重复性好、简便快速,如能结合培养物涂片抗酸染色镜下形态进行结果分析,可以减少假阳性或假阴性^[10],进一步提高鉴定结果的准确率。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. (2007-03-26)[2015-02-04]. http://www.who.int/tb/laboratory/use_of_liquid_tb_culture_summary_report.pdf.

[2] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 52-58.

[3] 沈国妙, 查佳, 徐琳, 等. 结核分枝杆菌散在分布重复单位基因型分型法的应用研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(5): 292-296.

[4] 张嵘, 蒋颜, 陈功祥, 等. 免疫色谱法抗MPB64单克隆抗体检测结核分枝杆菌菌群方法学评价[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 793-795.

[5] Yu MC, Chen HY, Wu MH, et al. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 802-807.

[6] 张院良, 蔡杏珊, 谭耀驹. 分泌蛋白在痰液及培养液中鉴定结核分枝杆菌复合群的应用研究[J]. 现代医院, 2011, 11(2): 17-19.

- [7] Muyoyeta M, de Haas PE, Mueller DH, et al. Evaluation of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* infections in Zambia and South Africa[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3773-3775.
- [8] 何霞, 谭守勇, 罗春明, 等. 应用MPT64为靶标快速检测结核分枝杆菌生长的研究[J]. 广东医学, 2010, 3(2): 222-224.
- [9] Machado D, Ramos J, Couto I, et al. Assessment of the BD MGIT TBc identification test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a network of mycobacteriology laboratories[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 398108.
- [10] Shen GH, Chen CH, Hung CH, et al. Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(3): 371-376.
- [11] Ngamlert K, Sinthuwattanawibool C, McCarthy KD, et al. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand[J]. Trop Med Int Health, 2009, 14(7): 748-753.
- [12] Lu PL, Yang YC, Huang SC, et al. Evaluation of the Bactec MGIT 960 system in combination with the MGIT TBc identification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 2290-2292.
- [13] 李国利, 赵铭, 张灵霞, 等. 免疫层析法检测MPT64蛋白在结核和非结核分枝杆菌鉴定中的临床应用价值[J]. 中国医药导报, 2012, 9(31): 152-153.
- [14] Shen GH, Chiou CS, Hu ST, et al. Rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by combining the ESAT-6/CFP-10 immunochromatographic assay and smear morphology[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 902-907.
- (收稿日期: 2015-02-04)
(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 汪源)

(上接第973页)

的情况下, leydig细胞分泌孕酮的能力却出现了显著性降低, 同时 *StAR*、*P450scc* 和 *3 β -HSD* 基因的 mRNA 表达水平也显著性降低。表明这个剂量范围内, HgCl_2 可能是通过抑制 *StAR*、*P450scc* 和 *3 β -HSD* 基因 mRNA 的表达而影响 leydig 细胞分泌类固醇激素, 从而表现出汞对雄性生殖系统的直接毒性作用。Sokol 等^[10]研究发现铅离子(Pb^{2+})可作用于 HPTA 导致血清睾酮水平下降, HgCl_2 也可能作用于 HPTA 而导致睾酮水平的降低, 孕酮是在 *P450c17*、*17 β -HSD* 的作用下转化为睾酮, 此环节也可能受到汞的影响。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 戚静宜, 孙莹璞. 环境因素对生殖健康的影响[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 11, 27(6): 355-358.
- [2] 刘玮, 申艳青. 汞对作业工人生殖功能影响的调查[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(2): 97-98.
- [3] Kim HB, Irvin RS, James JN. Lack of a heritable reproductive defect in the offspring of male rainbow trout exposed to the environmental estrogen 17 α -ethynylestradiol[J]. Aquat Toxicol, 2009, 91(1): 71-74.
- [4] 况海斌, 王新长, 方廉. 大鼠睾丸间质细胞分离及其鉴定[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(5): 7-9.
- [5] Zhang Z, Hu J. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR[J]. Toxicol Sci, 2007, 95(2): 356-368.
- [6] 廖卫公, 高钰琪, 蔡明春, 等. 低氧对雄性大鼠睾酮分泌及其合成相关蛋白和酶表达的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2006, 17(3): 191-195.
- [7] 杨雯雯, 常树丽, 李艳菲, 等. 氯化汞对小鼠睾丸间质瘤 mLTC-1 细胞增殖和孕酮合成的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(6): 1253-1255.
- [8] Ng TB, Liu WK. Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26(1): 24-28.
- [9] 陈小玉, 赵一波, 张巧. 氯化汞对雄性大鼠生殖毒性的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(6): 427-429.
- [10] Sokol RZ, Okuda H, Nagler HM, et al. Lead exposure *in vivo* alters the fertility potential of sperm *in vitro*[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1944, 124(2): 310-316.
- (收稿日期: 2015-03-05)
(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 葛宏妍)